

Molekularzytogenetische Charakterisierung
von Glioblastomen mit einer
oligodendroglialen Komponente
als Beitrag zur Einführung einer individuellen
Diagnostik

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Barbara Klink
geboren am 18. Oktober 1978 in Jena

6. Juni 2007

Erster Gutachter: Prof. Dr. Dr. S. Patt
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. U. Claussen
Dritter Gutachter: Prof. Dr. E. Schröck

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18.03.2008

Abkürzungsverzeichnis

A	Astrozytom
AA	Anaplastisches Astrozytom
ANCA	<i>average number of chromosome aberrations</i> (durchschnittliche Anzahl chromosomaler Aberrationen)
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
bit	<i>binary digit</i>
CCD	<i>charge coupled device</i> (Ladungsträgergekoppelte Schaltung)
CDK4	<i>cyclin-dependent kinase 4</i>
CDKN2C	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2C</i>
CDKN2A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
°C	Grad Celsius
CGH	<i>comparative genomic hybridization</i> (Vergleichende Genomische Hybridisierung)
CY5	Indodicarbocyanin
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindol-Hydrochlorid
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DOP-PCR	degenerierte Oligonukleotidprimer-PCR
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
dUTP	Desoxy-Uridintriphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor-rezeptor)
EST	<i>sequence tag</i>
FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung
FITC	Flourescein-isothiocyanat
GAC1	<i>glioma amplified on chromosome 1 protein</i>
GBM	Glioblastom

GBMO	Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente
GBMO-H	Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente und Honigwabenzellen
GBMO-R	Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente und rundlichen Zellen
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> (saures Gliafaserprotein)
<i>GRLF1</i>	<i>glucocorticoid receptor DNA binding factor</i>
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HG	Hintergrund
ISH	<i>In situ</i> -Hybridisierung
kb	Kilobasen
l	Liter
LB	Luria-Bertani Broth-Medium
LIG-PCR	<i>ligation mediated</i> (ligationsbasierte)-PCR
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
M	Mol
<i>MDM2</i>	<i>murine double minutes</i>
<i>MET/HGFR</i>	<i>hepatocyte growth factor receptor</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
ng	Nanogramm
N	Normal
NT-Puffer	Nicktranslation-Puffer
O	Oligodendrogliom
OA	Oligoastrozytom
OPA-Puffer	<i>One Phor All</i> -Puffer
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAC	<i>P1-derived artificial chromosom</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pg	Pikrogramm
<i>TP53</i>	<i>Tumor Protein p53</i>
<i>TP73</i>	<i>Tumor Protein p73</i>
<i>PTEN</i>	<i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i>
<i>RI</i>	<i>raw intensity</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)

rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
sec	Sekunde
SNP	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
<i>STS</i>	<i>sequence tagged site</i>
TRITC	<i>Tetramethyl Rhodamine</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-X nick end labeling</i>
U	<i>Units</i> (Maß für die Aktivität eines Enzyms)
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
V	Volt
WHO	<i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Gliome	3
2.2	Glioblastome mit einer oligodendroglialen Komponente	10
2.3	Molekularzytogenetische Untersuchungsmethoden	12
3	Zielstellung	15
4	Material und Methoden	17
4.1	Probanden, Patienten und Tumoren	17
4.1.1	Art und Herkunft der Tumore	17
4.1.2	Histologische Einteilung der Glioblastome	17
4.1.3	Patientendaten	18
4.1.4	Schnittserie der Paraffinblöcke und Mikrodissektion	20
4.1.5	DNA-Präparation aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebetteten Tumorgewebe	20
4.1.6	Präparation von Kontroll-DNA und Metaphasechromosomen . . .	21
4.1.7	Herstellung von DNA aus der Zelllinie SKBR3	22
4.2	Entwicklung der Sonden für die Interphase-FISH-Analyse	22
4.2.1	Literaturrecherche nach geeigneten Markern	22
4.2.2	Datenbankenrecherche nach BAC- bzw. PAC-Klonen	24
4.2.3	Gewinnung der BAC/PAC-DNA	24
4.2.4	Auswahl und Herstellung der Zentromersonden	27
4.2.5	Erstellen der SONDENSSETS für die Interphase-FISH-Analyse	28
4.3	Markierung der DNA	28
4.3.1	Nicktranslation	29
4.3.2	Amplifizierung und Markierung von DNA mittels PCR	30
4.3.3	Degenerierte Oligonukleotidprimer (DOP)-PCR	30
4.3.4	Ligationsbasierte (LIG)-PCR	31

4.3.5	<i>Random Priming</i>	33
4.3.6	<i>TdT-mediated dUTP-X nick end labeling</i> (TUNEL)	34
4.3.7	Chemische Markierung von DNA	35
4.3.8	<i>Rolling Circle Amplification</i>	35
4.3.9	Agarose-Gelelektrophorese	36
4.4	FISH-Technik	36
4.4.1	Vorbereitung der Metaphasechromosom-Objektträger	37
4.4.2	Fällung der DNA und Hybridisierung	37
4.4.3	Detektion	38
4.4.4	Bildaufnahme	39
4.5	Optimierung und Vergleich der Markierungsmethoden	39
4.6	Interphase-FISH-Untersuchungen von Paraffinmaterial	39
4.6.1	Behandlung der Paraffinschnitte	39
4.6.2	Markierung der Sonden	40
4.6.3	Hybridisierung	40
4.6.4	Detektion	40
4.6.5	Bildaufnahme	41
4.6.6	Auswertung	41
4.6.7	Hybridisierungs-Kontrolle	41
4.7	CGH-Analyse	42
4.7.1	Vorbehandlung der Metaphasechromosomen	42
4.7.2	Markierung der DNA	42
4.7.3	Hybridisierung	42
4.7.4	Detektion	42
4.7.5	Bildaufnahme und Auswertung	42
4.8	Statistik	43
5	Ergebnisse	44
5.1	Methodischer Teil	44
5.1.1	Optimierung, Vergleich und Entwicklung von Markierungsmethoden	44
5.1.2	Interphase-FISH-Untersuchung an Paraffinmaterial	51
5.1.3	Amplifizierung und Markierung genomischer DNA mittels PCR für die CGH-Analyse	52
5.1.4	Vergleich der CGH- und Interphase-FISH-Analysen	54
5.2	Interphase-FISH- und CGH-Untersuchung an Gliomen	54

5.2.1	Klinische Charakteristik der Glioblastompatienten	55
5.2.2	Genetische Veränderungen in den untersuchten Tumoren	55
5.2.3	Einfluss klinischer, histologischer und genetischer Merkmale auf die Überlebenszeit	68
6	Diskussion	73
6.1	Methodischer Teil	73
6.1.1	Optimierung der Interphase-FISH-Analyse	73
6.1.2	PCR-Amplifikation von DNA für die CGH-Analyse von paraffin- eingebettetem Tumorgewebe	82
6.1.3	Vergleich von Ergebnissen der Interphase-FISH- und CGH-Unter- suchungen	85
6.2	Untersuchung der Gliome	86
6.2.1	Einfluss einer oligodendroglialen Komponente auf die Prognose . .	86
6.2.2	Einfluss klinischer Parameter auf die Prognose	88
6.2.3	Genetische Charakterisierung der Gliome und Einfluss auf die Pro- gnose	89
7	Schlussfolgerung und Ausblick	104
	Literaturverzeichnis	106
A	Danksagung	131
B	Ehrenwörtliche Erklärung	132

1 Zusammenfassung

Glioblastome stellen die häufigsten und zugleich bösartigsten Tumoren des zentralen Nervensystems dar, deren Prognose mit einer medianen Überlebenszeit von weniger als einem Jahr nach wie vor sehr ungünstig ist (Ohgaki und Kleihues 2005b). Sie werden in die Gruppe der astrozytären Tumoren eingeordnet (Kleihues et al. 2000). In einem Teil der Glioblastome finden sich jedoch zusätzlich Areale mit einer oligodendroglialen Differenzierung (He et al. 2001). Diese Tumoren sind bisher nicht in der WHO-Klassifikation berücksichtigt und eindeutige diagnostische Kriterien fehlen. Sie sind jedoch interessant, da Oligodendrogliome, im Gegensatz zu astrozytären Gliomen, durch eine günstigere Prognose sowie ein gutes Ansprechen auf Chemotherapie gekennzeichnet sind (Reifenberger und Louis 2003, Okamoto et al. 2004). Dies ist korreliert mit dem Nachweis eines kombinierten Verlusts des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19 (Cairncross et al. 1998, Jaekle et al. 2006). Thema dieser Arbeit war es darum, Glioblastome mit einer oligodendroglialen Komponente (GBMO) genetisch zu charakterisieren, um molekulare Marker zu identifizieren, die prognostisch und diagnostisch relevant sein könnten.

Dafür wurden die beiden unterschiedlichen histologischen Anteile von 13 GBMO *getrennt* mittels Interphase-FISH- sowie nach Mikrodissektion mittels CGH-Analyse untersucht. Als unabhängige Vergleichsgruppe dienten 10 klassische Glioblastome (GBM) und drei Oligodendrogliome, zufällig ausgewählt aus dem Archiv für Pathologie in Jena, die mittels Interphase-FISH-Untersuchung analysiert wurden. Für die Interphase-FISH-Analyse wurde ein eigenes Sondenset bestehend aus „oligodendroglialen“ (1p,19q) und „astrozytären“ Markern (7q,10q,17p) entwickelt.

Die GBMO ließen sich mit Hilfe unseres Sondensets in vier genetische Gruppen unterteilen: (i) Neun der 13 GBMO wiesen eine Kombination aus Gewinn des langen Arms von Chromosom 7 und Verlust des langen Arms von Chromosom 10 auf und wurden genetisch in die „astrozytäre“ Gruppe eingeordnet; (ii) ein GBMO zeigte einen kombinierten Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19 und entsprach der „oligodendroglialen“ Gruppe; (iii) ein GBMO, welches eine Kombination der Veränderungen beider Gruppen aufwies – Gewinn des langen Arms von Chromosom 7 und Verlust von 1p36 – wurde als „intermediär“ eingestuft und (iv) zwei GBMO zeigten

keine für Gliome typische Veränderungen und wurden darum in eine vierte Gruppe – „andere“ – eingeordnet. Im Gegensatz zu den GBMO entsprachen alle klassischen GBM genetisch der „astrozytären“ Gruppe und alle Oligodendrogliome der „oligodendroglialen“ Gruppe. Die zwei unterschiedlichen histologischen Anteile der GBMO hatten, bis auf kleine Variationen, das gleiche genetische Profil. Es fanden sich auch keine spezifischen genetischen Marker, mit denen sich GBMO von klassischen GBM unterscheiden ließen. Allerdings hatten Patienten mit einem GBMO eine signifikant längere Überlebenszeit in multivariaten Analysen als Patienten mit einem klassischen GBM ($p = 0,005$). Dies traf sowohl für GBMO zu, welche Areale mit typischer Honigwabenstruktur aufwiesen, als auch für Tumoren mit Anteilen bestehend aus rundlichen, gleichförmigen, GFAP-negativen Zellen. Patienten mit einem GBM der genetischen Gruppe „andere“ überlebten signifikant länger als Patienten mit einem GBM der übrigen drei genetischen Gruppen. Ein Verlust auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 war der einzige signifikante, unabhängige, genetische, prognostische Faktor in allen untersuchten 23 Glioblastompatienten (13 GBMO und 10 GBM) und korrelierte mit einer kürzeren Überlebenszeit. In der CGH-Analyse der 13 GBMO fand sich ein Verlust nur des langen Arms von Chromosom 19 (mit Erhalt des kurzen Arms) nur in der Gruppe von Patienten, die länger als ein Jahr überlebten ($p = 0,045$). Der Verlust des gesamten Chromosom 19 hingegen war mit einer signifikant kürzeren Überlebenszeit verbunden ($p = 0,005$). Außerdem wurden weitere, bisher nicht beschriebene Aberrationen identifiziert, die in den GBMO mit einer kürzeren Überlebenszeit verbunden waren und interessante Kandidatenregionen für prognostische Marker darstellen.

Die Ergebnisse zeigten zum einen, dass alle untersuchten GBMO monoklonalen Ursprungs waren. Zum Anderen ließen sich die 13 GBMO auf Grund ihrer genetischen Veränderungen in vier verschiedene Gruppen einteilen, was auf unterschiedliche genetische Entstehungswege hinweist. Es stellte sich heraus, dass Patienten mit einem GBMO eine günstigere Prognose als Patienten mit einem klassischen GBM haben. Deshalb empfehle ich, die Diagnosegruppe GBMO in die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems aufzunehmen. Insgesamt unterstreichen die vorliegenden Ergebnisse die Bedeutung molekulargenetischer Untersuchungen zur Ergänzung der histologischen Diagnostik der Gliome sowie für die Identifizierung neuer prognostischer Marker. Ich halte es deshalb für notwendig, die Ergebnisse an einer größeren Zahl von Patienten, z. B. unter Zuhilfenahme von *Tissue arrays* und *Array-CGH*-Analysen, zu validieren.

2 Einleitung

2.1 Gliome

Der Anteil der primären Hirntumoren an der Gesamtzahl aller malignen Tumoren des Erwachsenenalters beträgt etwa 2 % (Kleihues et al. 2002) [Inzidenz in Westeuropa, Nordamerika und Australien 5-11/100.000 Einwohner und Jahr (Legler et al. 1999, Ferlay et al. 2000, Parkin et al. 2002, Ries et al. 2004)]. Der größte Teil dieser Tumoren – etwa 50-60 %, bei Erwachsenen höheren Lebensalters sogar 80-90 % – wird dabei von der Gruppe der Gliome gebildet (Prados 2000, Ohgaki und Kleihues 2005a). Von diesen wiederum handelt es sich in über der Hälfte der Fälle um ein Glioblastom (Ohgaki und Kleihues 2005b), einen hochmalignen Tumor, der eine der bedrohlichsten Krebsarten überhaupt darstellt mit einer medianen Überlebenszeit von weniger als einem Jahr (Burger und Green 1987, Forsyth und Cairncross 1995).

Die meisten Gliome wachsen diffus infiltrierend und sind somit nicht kurativ zu entfernen. Fast immer kommt es zum Rezidiv, häufig lokal. Dabei zeigen die Gliome typischerweise die Tendenz zur malignen Progression (Scherer 1940). Extrazerebrale Metastasierung kommt so gut wie nie vor, selten ist eine intrazerebrale Metastasierung zu beobachten.

Ob sich Gliome aus reifen Gliazellen oder neuroektodermalen Stammzellen entwickeln, ist unklar. Die histologische Diagnose basiert auf den morphologischen Ähnlichkeiten zwischen Tumorzellen und Gliazellen (Kleihues und Cavenee 2000).

Histologische Einteilung

Nach den Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zur Klassifikation der Tumoren des Nervensystems (Kleihues und Cavenee 2000) werden die Gliome entsprechend ihrer histologischen Übereinstimmungen mit normalen Gliazellen in drei Hauptgruppen eingeteilt: die Astrozytome als häufigste Gruppe, die Oligodendrogliome und die gemischten Gliome oder Oligoastrozytome. Außerdem werden noch die Ependymome, die hier nicht weiter betrachtet werden sollen, zu den Gliomen gezählt. Weiterhin sehen die WHO-Richtlinien eine Einteilung der Gliome entsprechend ihrer Dignität in vier

Malignitäts-Grade vor. WHO-Grad I und II entsprechen dabei eher gutartigen bis niedrig malignen, die WHO-Grade III und IV malignen bis hochmalignen Tumoren. Diese Einteilung richtet sich vor allem nach vier Kriterien: Kernatypien, mitotische Aktivität, Endothelproliferation und Nekrosen (Daumas-Duport et al. 1988).

In der Gruppe der Astrozytome wird das pilozytische Astrozytom (WHO-Grad I) von der Gruppe der diffusen Astrozytome (WHO-Grad II-IV) abgegrenzt. Das pilozytische Astrozytom ist ein gutartiger Tumor des Kindesalters, der in der Regel nicht weiter maligne entartet. Dagegen handelt es sich bei den diffusen Astrozytomen um Tumoren hauptsächlich des Erwachsenenalters, die typischerweise nach einer gewissen Zeit einer malignen Progression in höhere Malignitätsgrade unterliegen. Man unterteilt das diffuse Astrozytom WHO-Grad II in drei histologische Subtypen: das fibrilläre, das protoplasmatische und das gemistozytische Astrozytom, wobei letzteres die schlechteste Prognose der drei Gruppen hat und am häufigsten maligne entartet. Das anaplastische Astrozytom (WHO-Grad III) kann *de novo* entstehen, oder sich schrittweise aus einem Astrozytom WHO-Grad II entwickeln.

Der WHO-Grad IV der Astrozytome entspricht dem Glioblastom oder Glioblastoma multiforme, dem häufigsten und bösartigsten Gliom, welches durch multiforme, undifferenzierte Zellen, hohe Mitosezahl, glomeruläre Gefäßveränderungen und das Auftreten von Nekrosen gekennzeichnet ist (Burger und Green 1987). Ein Teil der Glioblastome (bis 5 %, (Ohgaki et al. 2004)), die sekundären Glioblastome, entwickelt sich schrittweise aus niedriggradigen Astrozytomen. Den größten Teil bilden jedoch die primären Glioblastome, die sich *de novo*, d.h. ohne erkennbare Vorstufen, bevorzugt bei älteren Patienten entwickeln und die schlechteste Prognose haben (Winger et al. 1989, von Deimling et al. 1995, Kleihues und Ohgaki 1999).

Bei den Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen werden nur die WHO-Grade II (Oligodendrogliom bzw. Oligoastrozytom) und III (anaplastisches Oligodendrogliom bzw. Oligoastrozytom) unterschieden, wobei auch hier der Übergang von dem WHO-Grad II in den WHO-Grad III typisch ist.

Immunhistochemie

Das saure Gliafaserprotein (GFAP) stellt ein wichtiges Differenzierungsantigen in der Neuroonkologie dar. Während astrozytär differenzierte Zellen GFAP exprimieren, sind Oligodendrozyten in der Regel GFAP-negativ. In Astrozytomen lässt sich GFAP regelmäßig in der Mehrheit der Tumorzellen nachweisen. In Oligodendrogliomen und Mischgliomen beschränkt sich die Expression von GFAP in der Regel auf astrozytäre Tumo-

relemente. Im Laufe der Entdifferenzierung von einem Astrozytom Grad II zu einem Glioblastom verliert sich die GFAP-Positivität in einem zunehmenden Teil der Tumorzellen (Reifenberger 1991).

Außer GFAP gibt es weitere Proteine, die in Gliomen exprimiert werden und der immunhistochemischen Darstellung zugänglich sind – sie wurden hier nicht weiter berücksichtigt.

Therapie

Es wird die operative Entfernung der Tumoren angestrebt, wobei durch den diffus infiltrierenden Charakter der Gliome keine Heilung erzielt werden kann und es in der Regel zu einem Rezidiv kommt. Zur Standardtherapie maligner Gliome gehört weiterhin die postoperative Bestrahlung (Kortmann et al. 2003, Krebsgesellschaft 2003), wodurch die mediane Überlebenszeit von Patienten mit malignen Gliomen um etwa 6 Monate verlängert wurde (Hofer et al. 1999, Kortmann et al. 2003). Für die Gruppe der Oligodendrogliome und Oligoastrozytome wurde zusätzlich ein Ansprechen auf Chemotherapie nachgewiesen (Buckner et al. 2003, Reifenberger und Louis 2003, Stege et al. 2005), welcher zunehmend der Vorzug gegenüber der Strahlentherapie als erste adjuvante Therapie bei diesen Tumoren gegeben wird (Krebsgesellschaft 2003). Dagegen war der Nutzen einer Chemotherapie für Patienten mit einem Astrozytom bzw. Glioblastom lange Zeit umstritten. In großen Studien bzw. Meta-Analysen wurde keine signifikante Überlebenszeitverbesserung gezeigt (Shapiro et al. 1989, Hildebrand et al. 1994, MedicalResearchCouncil 2001). In einer aktuellen Studie wurde nun ein besseres Überleben für Patienten mit einem Glioblastom nachgewiesen, die eine zusätzliche Chemotherapie mit Temozolomid erhielten (14,5 Monate vs. 12,5 Monate)(Stupp et al. 2005).

Prognose

Trotz intensiver Bemühungen und multimodaler Therapiestrategien – Operation, Bestrahlung und Chemotherapie – wurde die Überlebenszeit der Patienten mit malignen Gliomen bisher nur unwesentlich verbessert (Forsyth und Cairncross 1995, Sawaya 1999, Stewart 2002, Macdonald 2003). Prätherapeutische prognostische Faktoren scheinen den Krankheitsverlauf viel stärker zu beeinflussen. Dazu zählen v. a. ein jüngeres Lebensalter (<50 Jahre) und ein guter Allgemeinzustand (Karnofsky-Index 70-100 %), welche günstige prognostische Faktoren darstellen (Curran et al. 1993, Scott et al. 1998a, Tortosa et al. 2003, Ohgaki et al. 2004).

Weiterhin spielt die Histologie eine entscheidende Rolle. Patienten mit einem Astrozytom WHO-Grad II haben eine bessere Prognose als Patienten mit einem Astrozytom WHO-Grad III oder IV; Patienten mit einem Oligodendrogliom leben deutlich länger als Patienten mit einem Astrozytom gleichen Malignitätsgrades (Behin et al. 2003). Während die durchschnittliche Lebenserwartung für Patienten mit einem Astrozytom WHO-Grad II bei fünf Jahren liegt, beträgt sie für Patienten mit einem anaplastischen Astrozytom WHO-Grad III etwa zwei Jahre und für Patienten mit einem Glioblastom (WHO-Grad IV) nur etwa 5-11 Monate (Simpson et al. 1993, Hess et al. 2004, Okamoto et al. 2004, Ohgaki und Kleihues 2005b). Patienten mit einem Oligodendrogliom dagegen leben meist 10 Jahre und länger (Ludwig et al. 1986, Olson et al. 2000, Louis et al. 2002, Okamoto et al. 2004). Auch Oligoastrozytome haben eine günstige Prognose und liegen dabei zwischen der Gruppe der Oligodendrogliome und Astrozytome (Shaw et al. 1997, Okamoto et al. 2004, Ohgaki und Kleihues 2005b).

Allerdings schwanken die Überlebenszeiten und das klinische Verhalten einzelner Patienten innerhalb der histologischen Subgruppen beträchtlich (Jenkins et al. 2001, Behin et al. 2003, Tortosa et al. 2003). Beispielsweise überleben etwa 1,8-5 % der Patienten mit einem Glioblastom – sogenannte Langzeitüberleber – drei und mehr Jahre (Chandler et al. 1993, Scott et al. 1998b, McLendon und Halperin 2003). Auch scheint ein geringer Teil der Patienten mit einem malignen Astrozytom (WHO-Grad III-IV) (etwa 10-17 %) von einer Chemotherapie zu profitieren (Fine et al. 1993). Bisher ist es jedoch auf Grund fehlender Marker nicht möglich, eine prädiktive Aussage hinsichtlich Verlauf und Therapieansprechen für den individuellen Patienten zu treffen.

Einschränkung der histologischen Einteilung

Die Einteilung der Gliome nach der Malignität in drei WHO-Grade (II bis IV) ist für die Beschreibung der Progression der Astrozytome gut etabliert, weniger klar formulierbar dagegen ist die stufenweise Progression in der Gruppe der Oligodendrogliome und Oligoastrozytome (Schlegel et al. 2001). Vorgesehen sind hier lediglich die Malignitätsgrade II und III. Nekrosen in einem Oligodendrogliom berechtigen nicht zur Diagnose eines Glioblastoms. Einige Autoren (Kleihues et al. 1993b, Bigner et al. 1999, Burger und Scheithauer 2004) gehen von einem Übergang von Oligodendrogliomen in hochmaligne, undifferenzierte Tumoren aus, die histologisch nicht mehr von einem Glioblastom zu unterscheiden sind. Andere Autoren (Paulus und Peiffer 1989, Coons et al. 1997, Decaestecker et al. 1998) sind der Auffassung, dass in Glioblastomen oligodendrogliale Komponenten abgrenzbar sind und diskutieren die Möglichkeit einer eigenen Glioblas-

tomentität.

Die Unterscheidung zwischen Oligoastrozytom, Oligodendrogliom und Astrozytom als auch zwischen anaplastischem Gliom und Glioblastom durch den Neuropathologen ist zwar in der Routinearbeit anhand der WHO-Kriterien möglich, jedoch subjektiv und damit inter- und intrapersonell nicht ohne weiteres reproduzierbar (Ino et al. 2000, Smith et al. 2000a, Sasaki et al. 2002, Ueki et al. 2002, Fuller et al. 2003) Smith et al. 2000a. Es fehlen streng-objektive Unterscheidungsmarker (van den Bent 2004). So stieg z. B. der Anteil der Oligodendrogliome an den Gliomen in den letzten Jahren auffällig von 5-10 % auf 25-33 % an (Behin et al. 2003), wogegen der der Astrozytome entsprechend absank. Ursächlich für diese Entwicklung könnte das Wissen um die bessere Prognose der Oligodendrogliome und ihr gutes Ansprechen auf Chemotherapie sein, das zu einer großzügigeren Diagnosestellung führte.

Desweiteren sind Gliome histologisch oft sehr heterogen, mit Anteilen, die verschiedenen WHO-Graden entsprechen. Die Beurteilung eines nichtrepräsentativen Anteils kann so zu Missklassifikationen führen, v.a. bei kleineren stereotaktisch gewonnenen Tumorgewebsproben.

Genetische Untersuchungen an Gliomen zeigten außerdem, dass Tumoren mit gleicher histologischer Morphologie verschiedenen genetischen Subgruppen entsprechen können (Kleihues und Ohgaki 1999, Ino et al. 2001, Jeuken et al. 2001, Mueller et al. 2002).

Die genannten Beobachtungen erklären teilweise die großen Schwankungen in Prognose und klinischem Verhalten, die sich aus den bisherigen Untersuchungen an Gliomen ergeben. Einige Studien zeigten eindrücklich, dass eine falsche Klassifizierung dafür mitverantwortlich ist (Kraus et al. 2000b, Sasaki et al. 2002, McLendon und Halperin 2003). Die WHO hat sich zwar in ihrer letzten Klassifikation um strengere Kriterien bemüht (Kleihues et al. 2002), vor allem ältere Untersuchungen sind jedoch kritisch zu bewerten. Eine einheitliche, zuverlässige und vom Untersucher möglichst unabhängige Diagnosesicherung ist wünschenswert, nicht nur für die Therapieentscheidung und Prognoseeinschätzung, sondern auch für wissenschaftliche Untersuchungen. In Zukunft könnten Untersuchungen der genomischen und molekulargenetischen Veränderungen in Gliomen als wichtige diagnostische Kriterien dazu beitragen, die Klassifikation der Gliome zu verbessern und damit die Forschung an individuellen Therapiekonzepten zu forcieren.

Molekularbiologie der Gliome

Eine große Anzahl von Untersuchungen der molekulargenetischen Veränderungen, die mit Entwicklung und Progression von Gliomen assoziiert sind, wurde bereits durchge-

führt. Dabei wurden für die sekundären und primären (*de novo*) Glioblastome unterschiedliche genetische Entstehungswege beschrieben (von Deimling et al. 1995, Kleihues und Ohgaki 1999).

Ursächlich für die schrittweise Entstehung eines sekundären Glioblastoms aus einem Astrozytom WHO-Grad II scheint die Mutation des Tumorsuppressorgens *TP53* (*Tumor Protein p53*) bzw. der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17 einschließlich des *TP53*-Gens zu sein, welcher sich in über der Hälfte der Grad II-Astrozytome findet (von Deimling et al. 1992a, Collins 1999). Für die Progression zum anaplastischen Astrozytom sind der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 9 bzw. des *CDKN2A*- (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) Gens und des langen Arms von Chromosom 19 kennzeichnend (Schmidt et al. 1994, von Deimling et al. 1994b). Der Verlust von Chromosom 10 markiert den Übergang zum Glioblastom (Lang et al. 1994, Ohgaki et al. 1995). Dementsprechend findet man in sekundären Glioblastomen häufig Mutationen des *TP53*-Gens und/oder den Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17 (von Deimling et al. 1993, Watanabe et al. 1996, Schmidt et al. 2002) sowie die Verluste der langen Arme von Chromosom 10 (Fujisawa et al. 2000) und 19 (Nakamura et al. 2000).

Dagegen sind die primären, *de novo* entstandenen Glioblastome gekennzeichnet durch Amplifikation und/oder Überexpression des Gens für den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (*EGFR*) sowie der Gene *MDM2* und *CDK4*, Mutationen des *PTEN*- (*phosphatase and tensin homolog*) Gens und den Verlust des *gesamten* Chromosoms 10. Wie die sekundären Glioblastome zeigen sie ebenso den Verlust des *CDKN2A*-Gens. Mutationen des *TP53*-Gens bzw. der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17 sind hingegen eher selten (Lang et al. 1994, Patt et al. 1996, Watanabe et al. 1996, Biernat et al. 1997, Kleihues und Ohgaki 1999, Fujisawa et al. 2000, Ohgaki et al. 2004).

Allerdings können nur etwa zwei Drittel der Glioblastome auf Grund ihrer Genetik diesen beiden Entstehungswegen zugeordnet werden, weshalb weitere mögliche Entstehungswege postuliert werden (Lang et al. 1994, Kleihues und Ohgaki 1999).

Die häufigsten Veränderungen, die in primären und sekundären Glioblastomen gefunden wurden, sind der Gewinn des langen Arms von Chromosom 7 (50-85 % der Fälle) und der Verlust des langen Arms von Chromosom 10 (50-82 % der Fälle), die meist kombiniert auftraten (Bigner und Schröck 1997, Mohapatra et al. 1998, Wiltshire et al. 2000, Koschny et al. 2002). Der Gewinn des langen Arms von Chromosom 7 ist ein frühes Ereignis in der Entwicklung der Astrozytome und tritt bereits in den Astrozytomen WHO-Grad II auf (Schröck et al. 1996, Wessels et al. 2002, Hirose et al. 2003), während der Verlust des Chromosoms 10 ein spätes Ereignis in der Entwicklung der Glioblastome

darstellt (Fujisawa et al. 2000).

Bis auf den Verlust des langen Arms von Chromosom 10, der einen vom Malignitätsgrad unabhängigen, ungünstigen prognostischen Faktor darzustellen scheint (Balesaria et al. 1999, Schmidt et al. 2002, Ohgaki et al. 2004), wurde für keine der genannten Veränderungen ein Einfluss auf Überleben oder Therapie von Astrozytompatienten eindeutig nachgewiesen.

Ganz anders verhält es sich bei den Oligodendrogliomen. Diese sind charakterisiert durch einen Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 bzw. den kombinierten Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19 in bis zu 85 % der Fälle (Cairncross et al. 1998, Bigner et al. 1999, Smith et al. 1999, Gelpi et al. 2003, Fallon et al. 2004). Es wurde gezeigt, dass diese Veränderungen einen günstigen prognostischen Faktor sowohl für die Überlebenszeit, als auch für das Ansprechen auf Chemotherapie in Oligodendrogliomen darstellen (Cairncross et al. 1998, Bauman et al. 2000, Smith et al. 2000a, Ino et al. 2001, Jenkins et al. 2006, van den Bent et al. 2006). Bisher wurden jedoch die in diesen Regionen vermuteten Tumorsuppressorgene, die wahrscheinlich für die Entwicklung der Oligodendrogliome verantwortlich sind, nicht identifiziert.

Oligoastrozytome zeigen genetische Veränderungen, die entweder typischerweise in Oligodendrogliomen gefunden werden (Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19), oder mit Astrozytomen assoziiert sind (Mutationen des *TP53*-Gens und/oder Verlust des kurzen Arms von Chromosome 17) (Mueller et al. 2002, Reifenberger und Louis 2003, Ohgaki und Kleihues 2005b).

Die maligne Progression in Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen ist mit den gleichen genetischen Veränderungen wie in Astrozytomen verbunden: Verlust des kurzen Arms von Chromosom 9 bzw. des *CDKN2A* Gens und des langen Arms von Chromosom 10 (Bigner et al. 1999, Reifenberger und Louis 2003, Fuller et al. 2003, Fallon et al. 2004).

Durch Untersuchung mittels Vergleichender Genomischer Hybridisierung (CGH) wurden Oligoastrozytome in 4 genetische Subgruppen unterteilt: eine oligodendrogliale Gruppe (Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19), eine astrozytäre Gruppe (Verlust von Chromosom 10 und Gewinn von Chromosom 7, die evtl. der Gruppe mit Mutation des *TP53*-Gens entspricht), eine intermediäre Gruppe, die eine Kombination der Veränderung beider Gruppen zeigt (z. B. Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und Gewinn von Chromosom 7), sowie schließlich eine vierte Gruppe, die keine dieser Veränderungen aufweist (Jeuken et al. 2001). Eine ähn-

liche Unterteilung wurde auch für Oligodendrogliome nachgewiesen (Ino et al. 2001). Neue Untersuchungen gruppieren auch Astrozytome in zumindest die astrozytäre und die oligodendrogliale Gruppe (Hirose et al. 2003). Ebenso wurden Glioblastomen mit -1p/-19q identifiziert (Schmidt et al. 2002). Die prognostische und therapeutische Bedeutung des Verlusts des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19 in Astrozytomen und Oligoastrozytomen ist aber bisher, im Gegensatz zu den Oligodendrogliomen, umstritten (Ino et al. 2001, Schmidt et al. 2002, Okamoto et al. 2004)(Smith et al. 2000a).

2.2 Glioblastome mit einer oligodendroglialen Komponente

Obwohl Glioblastome primär zu den Astrozytomen gezählt werden, findet man in einem Teil dieser Tumore Gebiete mit oligodendroglial differenzierten Tumorzellen (Paulus und Peiffer 1989, Coons et al. 1997, Decaestecker et al. 1998, Bigner et al. 1999). Diese Zellen sind rund und das Zytoplasma ist im Paraffinschnitt herausgelöst und geschrumpft, was ihnen das Aussehen von Honigwaben bzw. Spiegeleiern gibt (Honigwaben- oder Spiegeleizellen); die immunhistochemische Färbung dieser Zellen mit GFAP ergibt in der Regel keine Reaktion. Im Gegensatz zu anaplastischen Oligodendrogliomen bestehen diese „Glioblastome mit einer oligodendroglialen Komponente“ in der Hauptsache aus einem astrozytären Anteil, der sich, im Unterschied zu anaplastischen Oligoastrozytomen, durch Zeichen höchster Malignität entsprechend eines Glioblastoms auszeichnet. Diese Gruppe wurde bisher nicht in die WHO-Klassifikation aufgenommen (Kleihues et al. 2000).

Kontrovers diskutiert wird die Frage, ob es sich bei Glioblastomen mit einer oligodendroglialen Komponente um die höchste Malignitätsstufe der Oligodendrogliome bzw. Oligoastrozytome handelt (He et al. 2001, Kraus et al. 2001a, Magnani et al. 2005). So werden diese Tumoren von einigen Autoren auch als Oligoastrozytome Grad IV bezeichnet (Kim et al. 1996, Fuller et al. 2003).

Ob sich Glioblastome mit einer oligodendroglialen Komponente von klassischen Glioblastomen hinsichtlich Prognose und Therapie unterscheiden ist unklar. Es gibt Hinweise, dass Patienten mit diesen Tumoren länger überleben als Patienten mit „gewöhnlichen“ Glioblastomen (Hilton et al. 2004, Pinto und Chimelli 2004). Da es zumindest wahrscheinlich ist, dass diese Patienten auch von einer Chemotherapie profitieren könnten, entsprechend der Beobachtungen, die in Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen gemacht wurden, empfehlen einige Autoren (He et al. 2001, Radner et al. 2002) hier die

Diagnose Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente zu stellen, um den Kliniker auf die Möglichkeit einer Chemotherapie hinzuweisen.

Der Anteil der Glioblastome mit einer oligodendroglialen Komponente an den Glioblastomen wird mit 3,5-17 % angegeben (Decaestecker et al. 1998, He et al. 2001, Hilton et al. 2004). Da bisherige Studien an Glioblastomen diese Tumoren einschließen, ist es möglich, dass sie zumindest teilweise für die chemotherapiesensiblen Glioblastome und Langzeitüberleber verantwortlich sind. Dafür sprechen Studien, in denen ein Teil der Langzeitüberleber als oligodendrogliale Tumoren reklassifiziert wurden, d.h. also aus der Gruppe der Glioblastome herausgenommen wurden (Morita et al. 1996, Scott et al. 1998b, DeAngelis et al. 1998, Kraus et al. 2000b).

Nur wenige Studien mit jeweils sehr kleinen Fallzahlen wurden bisher zur Genetik von Glioblastomen mit einer oligodendroglialen Komponente durchgeführt. Sie kommen zudem zu uneinheitlichen Ergebnissen. Nakamura et. al untersuchten 30 Glioblastome mittels sog. Allelverlustanalysen (loss of heterozygosity = LOH) und fanden in einem primären und einem sekundären Glioblastom jeweils den kombinierten Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19 (Nakamura et al. 2000). Bei beiden Tumoren beschrieben sie eine oligodendrogliale Komponente. Kraus et. al beschrieben in zwei von 13 untersuchten Glioblastomen mit oligodendroglialer Komponente einen Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und in einem Tumor den kombinierten Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19 (Kraus et al. 2001a). In keinem der Tumoren fand sich der für Glioblastome typische LOH auf dem langen Arm von Chromosom 10. He et. al untersuchten 25 Glioblastome mit einer oligodendroglialen Komponente und fanden eine höhere Rate an LOH auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (40 %) und dem langen Arm von Chromosom 19 (60 % der Fälle) als in klassischen Glioblastomen, sowie in 27 % der Fälle den kombinierten Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19 (He et al. 2001). Die für Glioblastome bekannten Veränderungen wie LOH des langen Arms von Chromosom 10 und Amplifikation des *EGFR*-Gens fanden sich jedoch genauso häufig wie in klassischen Glioblastomen (64 % und 44 % der Fälle). Fuller et al. untersuchten 17 Oligoastrozytome, die sie in den WHO-Grad IV einstufen (Fuller et al. 2003). Keiner dieser Tumoren zeigte einen Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 oder den kombinierten Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19. Walker et al. untersuchten die verschiedenen histologischen Anteile von 25 Gliomen mit heterogenem histologischen Phänotyp mittels LOH-Analyse, von denen zumindest drei Tumoren Glioblastome mit einer oligodendro-

glialen Komponente darstellten (Walker et al. 2003). Alle drei Tumoren wiesen einen Verlust des Chromosoms 10 in beiden histologischen Anteilen auf, aber keinen Verlust auf Chromosom 1 oder 19.

Nicht hinreichend untersucht ist die Frage, ob sich die histologisch verschiedenen Anteile in Glioblastomen mit einer oligodendroglialen Komponente auch genetisch unterscheiden, was Hinweise auf ihren Entstehungsweg geben könnte. Lediglich Walker et al. untersuchten die beiden Anteile von drei Glioblastomen mit oligodendroglialer Komponente *getrennt* und fanden keine Unterschiede (Walker et al. 2003). Untersuchungen der verschiedenen Anteile in Oligoastrozytomen sprechen teilweise für einen monoklonalen, teilweise für einen biklonalen Ursprung dieser Tumoren (Coons et al. 1995, Kraus et al. 1995, Dong et al. 2002).

2.3 Molekularzytogenetische Untersuchungsmethoden

Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Die *In situ*-Hybridisierung (ISH) verbindet zytogenetische mit molekulargenetischen Techniken. Das Prinzip der ISH beruht darauf, dass eine markierte, einzelsträngige DNA-Sequenz (Sonde) die Fähigkeit besitzt, sich an eine komplementäre, einzelsträngige, stationäre Ziel-DNA-Sequenz (Target) anzulagern und dabei einen DNA-Doppelstrang (Hybrid) zu bilden. Als Target dienen Metaphasechromosomen oder Interphasezellkerne, welche auf Objektträgern – *in situ* – fixiert sind.

Die ISH wurde in den 60er Jahren entwickelt. Damals verwendete man als Sonden radioaktiv markierte DNA und RNA (Pardue und Gall 1970). Anfang der 80er Jahre wurden Nukleinsäuren erstmals enzymatisch mit Haptenen (kleinen Molekülen) markiert, die mit Fluoreszenzfarbstoffen detektiert wurden (Langer et al. 1981). Im Folgenden werden die zwei in dieser Arbeit angewendeten FISH-Methoden näher erläutert.

Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

Die CGH-Untersuchung ermöglicht das Screening eines Test- (Tumor- oder Patienten) Genoms auf chromosomale Imbalancen (Amplifikationen, Duplikationen, Deletionen) (Kallioniemi et al. 1992, du Manoir et al. 1995). Sie beruht auf einem FISH-Experiment, bei dem die Test-DNA und eine Referenz- (Normal-) DNA mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und simultan auf normale Metaphasen hybridisiert werden, wo sie um homologe Bindungsstellen konkurrieren. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Tumor- und Normal-DNA spiegelt Über- oder Unterrepräsentationen und

damit Gewinne und Verluste in der Tumor-DNA wieder. Um eine quantifizierte Aussage zu ermöglichen, erfolgt die Auswertung über digital aufgenommene Bilder und mathematisch mit einem speziellen Computerprogramm (du Manoir et al. 1995, Piper et al. 1995).

Als Resultat erhält man ein Karyogramm mit den chromosomalen Veränderungen eines Tumors, ohne dass eine aufwendige Zellkultivierung und Chromosomenpräparation des zu untersuchenden Tumorgenoms, wie etwa für die konventionelle Zytogenetik, nötig ist. Normale Patienten-DNA aus Blut des Tumorpatienten, wie man sie für LOH-Untersuchungen braucht, wird ebenfalls nicht benötigt, da Kontroll-DNA und Metaphasen aus Leukozyten eines normalen Spenders hergestellt werden. Ein weiterer Vorteil der CGH-Untersuchung liegt in der Möglichkeit, retrospektive Studien durchführen zu können, indem DNA aus formalin-fixiertem, paraffin-eingebetteten Material verwendet wird (Speicher et al. 1993). Da diese DNA durch den Fixationsprozess fragmentiert und oft nur in geringeren Mengen vorhanden ist, ist eine Erhöhung der DNA-Menge durch Varianten der Polymerasekettenreaktion (PCR), die DOP- (degenerierte Oligonukleotidprimer) oder die LIG- (ligationsbasierte) PCR, notwendig, die eine möglichst homogene Amplifikation des gesamten Genoms gewährleisten (Telenius et al. 1992, Klein et al. 1999). Kombiniert mit Gewebs-Mikrodissektion lassen sich so auch Genotyp-Phänotyp-Korrelationen erzielen (Jung et al. 1999).

Der Nachteil der CGH-Analyse lag bisher in ihrem begrenzten Auflösungsvermögen ($>2\text{-}10\text{ MB}$) auf Metaphasechromosomen (Bentz et al. 1998, Bigner und Schröck 1997). Dies wurde neuerdings dadurch erheblich verbessert, dass BAC-Klone oder Oligonukleotide als DNA-Arrays für die Hybridisierungen genutzt werden. Die Array-CGH-Methode erreicht dadurch Auflösungen im kb-Bereich (Ishkanian et al. 2004). Die Detektion von LOHs wurde möglich durch den Einsatz von *SNP- (single nucleotide polymorphisms) Arrays* (Huang et al. 2004). Balancierte Aberrationen, wie Translokationen, Inversionen und Ringchromosomen, werden weiterhin durch CGH- oder *SNP*-Analysen nicht erfasst. Außerdem sind die Ergebnisse für heterochromatinreiche Regionen – z. B. auf 1p, 19, 16, 22 – nicht verlässlich (Kallioniemi et al. 1994). Desweiteren werden meist nur Veränderungen erkannt, die in mehr als 40 % der Zellen vorliegen (du Manoir et al. 1995). Die Auflösung heterogener Tumoren in Tumorzellklone sowie die Zuordnungen von Aberrationen zu einzelnen Zellen mit typischer Morphologie ist nicht möglich.

Interphase-FISH

Bei der Interphase-FISH-Untersuchung dienen Tumor-Interphasezellkerne (z. B. aus Abklatschpräparaten, – sogenannten *Imprints* –, oder aus Paraffinschnitten) als Hybridisierungstargets. Mehrere sequenz-spezifische DNA-Sonden, z. B. BACs (*bacterial artificial chromosomes*), PACs (*P1-derived artificial chromosom*) oder Zentromerproben (alpha-Satelliten-Proben), können mit verschiedenen Fluorochromen markiert und gleichzeitig hybridisiert werden. Die Anzahl der FISH-Signale dieser Sonden kann für jeden einzelnen Zellkern ermittelt werden. Damit sind Aussagen möglich zu numerischen chromosomalen Aberrationen für die untersuchten Bereiche sowie zur Ploidie der Zellkerne.

Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass hierbei ganz auf eine DNA-Präparation oder Zellkultivierung aus Tumorgewebe verzichtet wird. Auch kleine Veränderungen, die der CGH durch ihre schlechte Auflösung entgehen, können so zuverlässig erkannt werden (Werner et al. 1997). Außerdem liegt die Nachweisgrenze von Veränderungen bei DNA-Gewinn im Bereich von 2-5 % und bei Verlust bei 10 % und somit deutlich unter der Detektionsgrenze von LOH- oder CGH-Analysen. Die Verwendung von Paraffinschnitten erlaubt dabei den direkten Vergleich von Genetik und Morphologie. Das macht die Methode besonders geeignet für die Aufdeckung von intratumoraler Heterogenität, z. B. in Mischtumoren (Smith et al. 2000a, Loeper et al. 2001). Allerdings werden LOHs ebenfalls nicht erfasst.

3 Zielstellung

Die Existenz von Glioblastomen mit einer oligodendroglialen Komponente könnte ein Hinweis darauf sein, dass einige Glioblastome einen oligodendroglialen Ursprung haben und eine eigene Tumorentität darstellen, die sich von den „klassischen“ Glioblastomen unterscheidet. Um diese Hypothese zu testen und vor dem Hintergrund, dass es keine klaren histologischen Kriterien gibt, welche die Abgrenzung der astrozytären von den oligodendroglialen Tumoren ermöglichen, war es Ziel der Arbeit, Glioblastome mit einer oligodendroglialen Komponente *genetisch* zu charakterisieren. Dafür sollten die histologisch unterschiedlichen Anteile dieser Tumoren molekularzytogenetisch *getrennt* untersucht werden, um Aussagen über Klonalität und Herkunft der Tumoren treffen zu können. Bisherige Studien zu diesem Thema sind rar und kommen zu keinem einheitlichen Ergebnis.

Mittels Interphase-FISH-Analyse von Paraffinschnitten und unter Verwendung eines eigens entwickelten SONDENSETS sollten die verschiedenen histologischen Anteile von 13 Glioblastomen mit einer oligodendroglialen Komponente sowie zehn Glioblastome und drei Oligodendrogliome zum Vergleich auf „astrozytäre“ und „oligodendrogliale“ genetische Marker hin analysiert werden. Unter genetischen Markern verstehe ich in diesem Zusammenhang solche genetischen Veränderungen, die bevorzugt in einer bestimmten Tumorentität gefunden werden und darum für eine Charakterisierung neoplastischer Zellen bzw. Komponenten eines Tumors in Frage kommen sowie für die Artdiagnose hilfreich sein können. Als „oligodendrogliale“ Marker wählte ich deshalb den Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19 und als „astrozytäre“ Marker den Verlust des langen Arms von Chromosom 10, den Gewinn des langen Arms von Chromosom 7 und den Verlust des *TP53*-Gens.

Um außerdem einen Überblick über die genetischen Veränderungen der Tumorareale zu erhalten, sollten die verschiedenen histologischen Anteile der 13 Glioblastome mit einer oligodendroglialen Komponente mikrodiseziert und mittels CGH-Untersuchung analysiert werden.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollten die genetischen (und histologischen) Befunde dem klinischen Verlauf gegenübergestellt werden (Überlebenszeit), um Aussagen über ihre prognostische Relevanz treffen zu können.

Die Interphase-FISH-Technik stellt eine vielversprechende und zuverlässige Methode dar, Tumoren routinemäßig auf genetische Veränderungen zu untersuchen und damit die Diagnostik von Gliomen zu verbessern. Ein dritter Teil der Arbeit bestand deshalb darin, diese Untersuchungsmethode zu optimieren, um sie für die Routine-Diagnostik der Glioblastome mit oligodendroglialer Komponente besser einsetzbar zu machen. Dafür sollten verschiedene Methoden zur Herstellung und Markierung von DNA-Sonden verglichen bzw. entwickelt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Probanden, Patienten und Tumoren

4.1.1 Art und Herkunft der Tumore

Es wurden formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Hirntumorgewebsstücke von 26 Patienten mit der Interphase-FISH-Technik und CGH-Analyse untersucht. Bei 23 Patienten lag die Diagnose eines Glioblastoms (GBM), bei drei Patienten die eines Oligodendroglioms (O), vor. Das verwendete Tumormaterial entstammte dem Archiv des Instituts für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Die Operationen fanden im Zeitraum von 1997 bis 2002 in den Neurochirurgien von Jena und Bad Berka sowie in der Neurochirurgischen Abteilung des Krankenhauses Bergmannstrost in Halle statt. Die Diagnosestellung erfolgte am Institut für Pathologie Jena durch Prof. Dr. med. S. Patt entsprechend den WHO-Richtlinien (Kleihues und Cavenee 2000). Für einen Tumor (ID 7) wurde ein Zweitgutachten am Hirntumorreferenzzentrum an der Universität Bonn erstellt.

4.1.2 Histologische Einteilung der Glioblastome

Die 23 Glioblastome wurden in drei Gruppen unterteilt, von denen zwei Gruppen Glioblastome mit histologischen Besonderheiten darstellten, welche als oligodendrogliale Komponente interpretiert wurden (GBMO) (Jeuken et al. 2001, Kraus et al. 2001a). Die dritte Gruppe entsprach den klassischen Glioblastomen (GBM). Die Einteilung erfolgte anhand aus der Routinepathologie vorliegender HE- (Hämatoxylin-Eosin) Schnitte und der Immunreaktion mit GFAP:

- **Glioblastome mit Honigwabenzellen (GBMO-H):** Acht Tumore mit zusammenhängenden Abschnitten mit typischer Honigwabenstruktur (vornehmlich runden Zellen mit klarem Zytoplasma und zentralem Kern) und GFAP-Negativität wurden als Glioblastome mit oligodendroglialer Komponente mit Honigwabenzellen (GBMO-H) bezeichnet (Abb. 4.1).
- **Glioblastome mit runden Zellen (GBMO-R):** Fünf Tumore mit Arealen, die

durch auffällig runde, gleichförmige, oligodendroglia-ähnliche Zellen und GFAP-Negativität gekennzeichnet waren, jedoch keine deutliche Honigwabenstruktur aufwiesen, wurden als Glioblastome mit oligodendroglialer Komponente mit runden Zellen (GBMO-R) geführt (Abb. 4.1).

- **Glioblastome ohne histologische Besonderheiten (GBM):** Die dritte Gruppe bildeten 10 klassische Glioblastome (GBM), wobei zwischen multiformem und kleinzelligen Subtyp nicht unterschieden wurde.

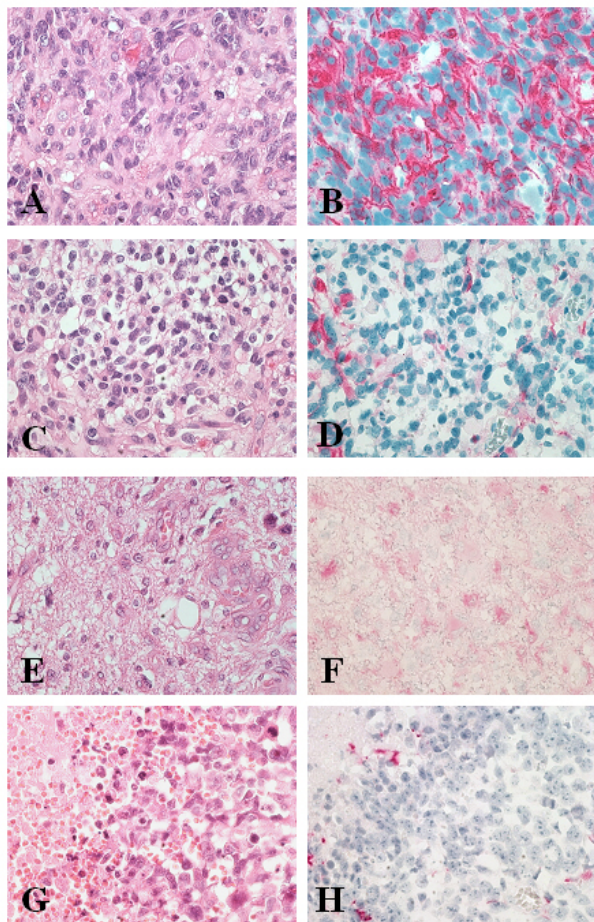


Abb. 4.1: Histologie (HE) und Immunhistochemie (GFAP) eines GBMO-H und eines GBMO-R. Auf der linken Seite ist jeweils die HE-Färbung dargestellt. Rechts erkennt man die immunhistochemische Markierung mit dem Antikörper gegen GFAP (rot angefärbt), Kerne sind blau gegengefärbt. A-D: GBMO-H (ID 11): (A) längliche Tumorzellen des astrozytären Abschnitts mit GFAP-Positivität (B), (C) Honigwabentextur des oligodendroglialen Abschnitts mit GFAP-Negativität (D). E-H: GBMO-R (ID 9): (E): Abschnitt mit klassischer GBM-Histologie und partieller GFAP-Positivität (F), (G): Zelldichter Abschnitt ohne Honigwaben, jedoch mit kompletter GFAP-Negativität (H). A-H: x 350

4.1.3 Patientendaten

Die klinischen Daten der Patienten, die pathologische Diagnose und die histologische Gruppenzuordnung der Tumoren sind in Tab. 4.1 zusammengefasst.

Tab. 4.1: Klinisch-pathologische Patientendaten

ID	Alter ³ / Geschlecht	Diagnose	Typ	Lokali- sation	Rezi- div ⁴	eigene Einteilung	Her- kunft	Überleben in d ⁵	Therapie
1	52 / m	GB IV (A III-Rez)	S	re, t	-	GBMO-H	J	102	-
2	72 / m	GB IV	P	re, p-t	-	GBMO-H	J	166	-
3	62 / w	GB IV	P	re, t	X	GBMO-H	H	305	R
4	59 / m	GB IV	P	li, poz	-	GBMO-H	BB	z454	R/Ch T
5	66 / m	GB IV	P	n.a.	L	GBMO-R	J	326	R/Ch T
6	46 / w	O III-GB IV ¹	P	re, f-t	X	GBMO-H	BB	365	R/Ch PCV
7	42 / w	O III / GB IV ²	P	re, f-prz	-	GBMO-H	BB	141	R/Ch
8	70 / w	GB IV	P	li, p-t	X	GBMO-R	H	z246	-
9	51 / m	GB IV	P	re, f	X	GBMO-R	H	z176	R
10	46 / w	GB IV	P	li, p-o	X	GBMO-R	H	487	R
11	50 / w	GB IV	P	re, z	X	GBMO-H	BB	597	R/Ch N A
12	46 / m	GB IV (O III-Rez)	S	re	L	GBMO-R	J	479	R/Ch
13	58 / w	GB IV	P	re	X	GBMO-H	J	744	R
14	75 / m	GB IV	P	re, p	-	GBM	J	67	-
15	66 / w	GB IV (GB-Rez)	P	re, f	X	GBM	H	414	R/Ch T
16	53 / m	GB IV	P	re, f-p-t	L	GBM	J	196	R
17	64 / w	GB IV	P	re, t	X	GBM	J	373	R/Ch T
18	69 / m	GB IV	P	re, p-o	X	GBM	BB	290	R
19	70 / m	GB IV	P	re, f	-	GBM	H	z65	R
20	72 / w	GB IV	P	li, prz	-	GBM	J	140	R
21	46 / m	GB IV	P	li, f	X	GBM	BB	z397	R/Ch A
22	48 / w	GB IV (GB-Rez)	P	li	-	GBM	J	232	R
23	75 / m	GB IV	P	re, f	-	GBM	J	413	R
24	31 / m	O III (O II-Rez)		n.b.	n.b.	O III	J	n.b.	n.b.
25	31 / m	O II		n.b.	n.b.	O II	J	n.b.	n.b.
26	33 / m	O II		n.b.	n.b.	O II	J	n.b.	n.b.

¹: Für ein GBM (ID 6) lautete die pathologische Diagnose anaplastisches O III mit kleinherdigem Übergang in ein GB IV ²: Tumor ID 7 wurde von Prof. Patt als O III eingestuft und vom Hirntumorreferenzzentrum in Bonn als GB IV mit oligodendroglialer Komponente. Es wurde sich für die Diagnose GB IV entschieden. ³: Alter in Jahren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. ⁴: Weiteres Rezidiv nach Operation des von uns untersuchten Tumors. ⁵: Überlebenszeit in Tagen vom Zeitpunkt der Operation bis zum Todeszeitpunkt bzw. dem letzten offiziellen Kontakt (zensierte Daten). Abkürzungen: ID = Identifikationsnummer, E-Nr. = Eingangsnummer, m = männlich, w = weiblich, OIII = anaplastisches Oligodendrogliom, O II = Oligodendrogliom WHO Grad II, A III = anaplastisches Astrozytom, GB IV = Glioblastom WHO Grad IV, P = Primäres Glioblastom, S = Sekundäres Glioblastom, re = rechts, li = links, t = temporal, p = parietal, poz = postzentral, f = frontal, prz = präzentral, o = occipital, z = zentral, Rez = Rezidiv, X = späteres Rezidiv, L = lokale Progression, n.b. = nicht bekannt, GBMO-H = Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente mit Honigwabenstruktur, GBMO-R = Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente mit rundlichen Zellen, GBM = *klassisches* Glioblastom, J = Jena, H = Halle, BB = Bad Berka, d = Tage, z = zensiert (Todeszeitpunkt nicht bekannt), R = Radiatio, Ch = Chemotherapie, T = Temodal, PCV = Procarbazin, CCNU, Vincristin, A = ACNU, N = Nimustin

4.1.4 Schnittserie der Paraffinblöcke und Mikrodissektion

Von den 13 GBMO wurden ein bis zwei Paraffinblöcke ausgewählt, die den oligodendroglialen Anteil (Honigwabennetze oder runde Zellen mit GFAP-Negativität) und einen astrozytären Anteil (GFAP-positive Zellen mit astrozytärem Erscheinungsbild) enthielten. Von den 10 GBM und den drei O wurde jeweils ein für den Tumor repräsentativer Paraffinblock ausgesucht.

Um die Anwesenheit der histologischen Anteile sicherzustellen, wurden die Paraffinblöcke nach einem spezifischen Schema geschnitten (Abb. 4.2):

1. Zunächst wurde ein 5 μm dicker HE-Schnitt angefertigt, um die histopathologische Diagnose zu bestätigen.
2. Für die Interphase-FISH-Untersuchung wurden vier bis sechs Schnitte von je 10 μm Dicke durch Erhitzen auf einer Thermoplatte auf Superfrost+ Objektträger fixiert. Die Schnitte folgten direkt dem HE-Schnitt, um sicherzustellen, dass alle Anteile des Tumors enthalten waren. Von zwei Tumoren (ID 23 und 24) wurden Schnitte von 6, 8, 10 und 12 μm Dicke angefertigt, um die optimale Schnittdicke für die Interphase-FISH-Analyse zu bestimmen.
3. Für die Mikrodissektion des oligodendroglialen und astrozytären Anteils zur Gewinnung von DNA für die CGH-Analyse wurden fünf weitere 10 μm dicke Schnitte hergestellt und auf normale Objektträger aufgebracht.
4. Zuletzt wurde nochmals ein HE-Schnitt angefertigt, um sicherzustellen, dass noch alle untersuchten Anteile des Tumors in dem Paraffinblock enthalten waren.

Unter dem 40er-Objektiv eines Durchlichtmikroskops wurden die anhand des HE-Schnitts ausgewählten Anteile der unter 3. genannten Schnitte mit einer sterilen Kanüle abgetrennt und in Eppendorf-Gefäße gegeben (Abb. 4.2). Der Durchmesser der mikrodissezierten Areale betrug bei den verschiedenen Tumoren 2-20 mm.

4.1.5 DNA-Präparation aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebetteten Tumorgewebe

Das Tumorgewebe wurde dreimal für je 5 min bei 55 °C in 100%igem Xylol entparaffiniert. Anschließend wurde es zweimal für je 5 min mit 100%igem Isopropanol und einmal 5 min mit 100%igem Ethanol gewaschen. Die Probe wurde 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und nach Entfernung des Alkohols in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das

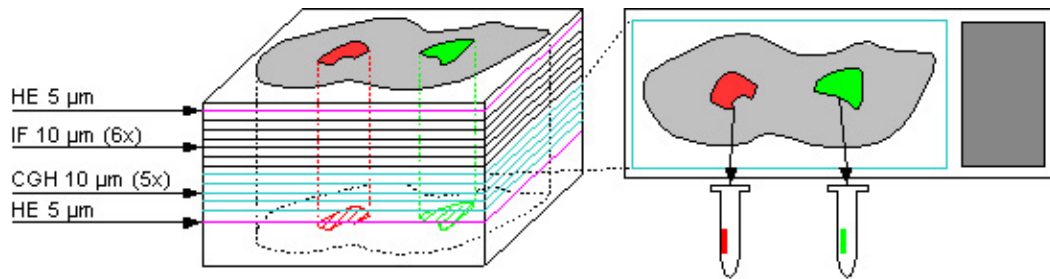


Abb. 4.2: Schnittserie eines Paraffinblocks und Mikrodisektion. Grau: Tumorgewebsstück, grün: astrozytärer Anteil, rot: oligodendroglialer Anteil. Links: Schnittserie eines Paraffinblocks mit eingebettetem, formalinfixiertem Tumorgewebsstück. Rechts: Aufsicht eines Objektträgers mit Paraffinschnitt und Mikrodisektion des astrozytären und oligodendroglialen Anteils mit einer sterilen Kanüle. Abkürzungen: HE = Hämatoxylin-Eosin, IF = Interphase-FISH, CGH = Vergleichende Genomische Hybridisierung.

Gewebe wurde in 1 ml NaSCN (1 M) über Nacht bei 37 °C inkubiert und das NaSCN nach erneuter Zentrifugation entfernt. Nach Zugabe von 200 µl ATL-Puffer (*QIAamp DNA Mini Kit*; Qiagen, Hilden, D) folgte der Proteinase K-Verdau durch wiederholte Zugabe von 20 µl Proteinase K (20 mg/ml in 20 mM Tris, pH 8; Merck, Darmstadt, D) alle 12 h je nach Gewebemenge für insgesamt 24-48 h bei 55 °C. Die DNA-Extraktion mit dem *QIAamp DNA Mini Kit* folgte dem Qiagen-Protokoll Schritt 3a bis 7a. Die Eluierung erfolgte durch Beladen der Säule mit 50 µl H₂O, Inkubation bei 55 °C für 10 min und Zentrifugation bei 8.000 rpm für 1 min. Anschließend wurde das Eluat erneut auf die Säule gegeben und die Prozedur wiederholt. Die gewonnene DNA wurde bei 4 °C aufbewahrt.

4.1.6 Präparation von Kontroll-DNA und Metaphasechromosomen

Kontroll-DNA für die CGH-Untersuchung und normale Metaphasechromosomen für CGH- und Interphase-FISH-Analyse wurden aus Blut von gesunden männlichen und weiblichen Probanden hergestellt.

DNA-Präparation aus Lymphozyten: Zu 10 ml Blut wurden 30 ml Lyse-Puffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,4) gegeben und die Lösung wurde leicht geschüttelt, bis sie klar erschien. Nach Zentrifugation für 10 min bei 1.200 rpm und 4 °C wurde der Überstand entfernt, erneut 10 ml Lyse-Puffer zugegeben, zentrifugiert und der Überstand wiederum entfernt. Das entstandene Pellet wurde in 5 ml SE-Puffer (75 mM NaCl, 25 mM Na₂EDTA, pH 8) aufgenommen, die Lösung wie oben beschrieben zentrifugiert und das Pellet in 5 ml SE-Puffer gelöst. Nach Zugabe von 40 µl Proteinase K (10 mg/ml; Merck), 70 µl RNase (10 mg/ml; Roche, Mannheim, D) und 250 µl 20%igem SDS folgte der Verdau bei 37 °C über Nacht. Die DNA-Extraktion erfolgte in drei Schritten durch jeweilige Zugabe von 10 ml Phenol, Phenol/Chloroform

(1:1), Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), Zentrifugation für 5 min bei 3.000 rpm und Weiterführung des Überstands. Die DNA wurde mit 500 μ l Natriumacetat (3 M) und 10 ml Isopropanol gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in H₂O aufgenommen.

Präparation normaler Metaphasechromosomen: 10 ml Blut wurden für 10 min bei 1.000 rpm zentrifugiert und die Lymphozytenschicht in 40 ml Lymphozyten-Kulturmedium (RPMI 1640 Medium [*GibcoBRL*, Eggenstein, D] versetzt mit Antibiotikum-Antimykotikum-Mix 1:100 [10.000 U/ml Penicillin, 10.000 μ g/ml Streptomycin, 25 μ g/ml Amphotericin B; *GibcoBRL*], Phytohemagglutinin [1:100] und 20%iges hitzeinaktiviertes Kälberserum [*GibcoBRL*]) gegeben. Die Zellkultur erfolgte in 250 ml Zellkulturflaschen für 72 h in einem 5 % CO₂-Brutschrank bei 37 °C. Nach Zugabe von 500 μ l Colcemid (10 μ g/ml; *GibcoBRL*) wurde die Lösung in 50-ml-Gefäße gegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde für 12 min bei 1.200 rpm zentrifugiert und der Überstand bis auf 5 ml entfernt. Mit 37 °C warmer, 0,4%iger KCl-Lösung wurde auf 40 ml aufgefüllt, gemischt, 10 min bei 37 °C inkubiert und erneut wie beschrieben zentrifugiert und abpipettiert. Die Prozedur wurde nach Auffüllen mit frischem Fixativ (Methanol/Eisessig, 3:1) auf 25 ml wiederholt und die verbliebene Lösung in ein 15 ml-Gefäß verbracht. Diese wurde auf 10 ml mit Fixativ aufgefüllt, wie beschrieben inkubiert, zentrifugiert und der Überstand bis auf 2 ml entfernt. Der Vorgang wurde viermal wiederholt und das entstandene Pellet in 4-6 ml Fixativ aufgenommen. Je 100 μ l der Fixativ-Zellsuspension wurden auf mit Fixativ gereinigte Objektträger getropft und das Fixativ bei Temperaturen zwischen 37 °C und 65 °C und wechselnder Luftfeuchtigkeit verdampft. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-, 90- und 100%iges Ethanol) und Inkubation bei 37 °C für drei bis vier Tage wurden die Objektträger für zwei Wochen in 100%igem Ethanol bzw. dauerhaft bei -80 °C aufbewahrt.

4.1.7 Herstellung von DNA aus der Zelllinie SKBR3

Die DNA-Präparation der Zelllinie SKBR3 (*American Type Culture Collection (ATCC)*, Manassas, VA, USA) erfolgte wie in Abschnitt 4.1.6 (DNA-Präparation aus Lymphozyten) beschrieben.

4.2 Entwicklung der Sonden für die Interphase-FISH-Analyse

4.2.1 Literaturrecherche nach geeigneten Markern

Anhand der Literatur über CGH- und LOH-Untersuchungen an Gliomen wurden so genannte oligodendrogiale und astrozytäre Marker für die Interphase-FISH-Untersuchung

sowie Kontroll-Regionen ausgewählt.

- Als oligodendrogliale Marker wurden der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19 gewählt (siehe S.9), auf denen Tumorsuppressorgene vermutet werden. Mittels LOH-Untersuchungen wurde die Region für das Tumorsuppressorgen auf 19q auf die Bande 19q13.3 zwischen den genetischen Markern D19S412 und STD (Rosenberg et al. 1996, Smith et al. 1999) eingeschränkt. In diesem Bereich liegt das Tumorsuppressorgen *GRLF1* (*glucocorticoid receptor DNA binding factor 1*) (Tikoo et al. 2000), welches für diese Arbeit ausgewählt wurde. Für den kurzen Arm von Chromosom 1 werden mindestens drei Kandidatenregionen angenommen: 1p36, 1p34 und 1p32 (Bello et al. 1995, Husemann et al. 1999). Für diese Arbeit wurde das Tumorsuppressorgen *CDKN2C* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2C*)/*P18^{INK4C}* auf der Bande 1p32 gewählt, welches in verschiedenen humanen Tumoren mutiert und homolog zu den Zellzyklusregulatoren *CDKN2A*, *-B* und *-C* ist und somit ein starkes Kandidatentumorsuppressorgen in Oligodendrogliomen darstellt (He et al. 2000) sowie auf 1p36 das Gen *TP73* (*Tumor Protein p73*), dessen Genprodukt strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu *TP53* aufweist (Alonso et al. 2001).
- Als astrozytäre Marker wurden der Gewinn des langen Arms von Chromosom 7 und der Verlust des langen Arms von Chromosom 10 ausgewählt (siehe S.8). Auf dem langen Arm von Chromosom 7 wurde das Onkogen *MET/HGFR* (*hepatocyte growth factor receptor*) auf der Bande 7q31.2 ausgewählt. Das Tumorsuppressorgen *PTEN* auf der Bande 10q23.3 ist eines der bekannten Gene, die an der Entstehung von Glioblastomen beteiligt sind. Zusätzlich wurde das Tumorsuppressorgen *TP53* auf der Bande 17p13.1 ausgewählt.
- Außerdem wurden Marker gesucht, die in Gliomen möglichst selten Veränderungen aufweisen, als Kontrolle für Ploidie (Ursache für falsch-positive Gewinne) und Heterogenität des Tumors und als Referenz für die Menge an abgeschnittenen Kernen (Ursache für falsch-positive Verluste). Dafür wurden die Chromosomen 21 und 18 gewählt, die in der Literatur über CGH-Untersuchungen an GBM und O selten als verändert beschrieben sind (Nishizaki et al. 1998, Mohapatra et al. 1998, Huhn et al. 1999, Jeuken et al. 1999, Kros et al. 1999, Jeuken et al. 2001, Koschny et al. 2002). Um einschätzen zu können, ob das gesamte Chromosom 1 oder nur der kurze Arm des Chromosom 1 verändert war, wurde zusätzlich eine Region auf dem langen Arm von Chromosom 1 einbezogen. Ausgewählt wurde *GAC1* (*glioma*

amplified on chromosome 1 protein) auf der Bande 1q32, welches in Glioblastomen amplifiziert und überexprimiert ist (Schröck et al. 1994).

4.2.2 Datenbankenrecherche nach BAC- bzw. PAC-Klonen

Es wurden 2 Methoden verwendet, BAC/PAC-Klone für die gewählten Regionen herauszusuchen.

1. Mit Hilfe der Sequenzen der ausgewählten Gene (<http://www.rzpd.de/cards>) wurde im *BLAST* der NCBI-Seite (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) eine Suche in der *nr*-Datenbank (*non redundant*) bzw. *htgs*-Datenbank (*high throughput genome sequences*) gestartet. In der *nr*-Datenbank findet man die Klone, deren humanes *Insert* endgültig sequenziert wurde (Phase 3 des Humanen Genomprojekts). Klone der Phasen 0, 1 oder 2 (Sequenzinformation sind fehlerhaft; nur Teilsequenzinformationen von einzelnen Klonen sind vorhanden) oder Sequenzschnipsel (*EST* [*sequence tag*], *STS* [*sequence tagged site*]) werden unter der Suchoption *htgs* zusammengefasst.
2. Die Datenbank *UCSC Genome Browser* (<http://www.genome.ucsc.edu>) vereinigt die verschiedensten Informationen (Abb. 4.3). Unter anderem kann eine bestimmte Position des menschlichen Genoms in Megabasen entlang des Chromosoms (*Base Position*) oder als zytogenetische Bande (*Chromosome Band*) spezifiziert werden, die Lage von Genen abgelesen werden (*Known Genes*), in der Region liegende bereits FISH-kartierte (*FISH Clones*), vollständig sequenzierte (*Clone Coverage*) oder nur an den Enden ansequenzierte (*BAC-end pairs*) Klone ermittelt werden sowie die Position eines *EST*- oder *STS*-Markers angegeben werden. Um Klone für die gewählten Regionen herauszusuchen, wurden die Optionen *Base Position*, *Chromosome Band*, *Clone Coverage*, *FISH Clones*, *BAC-end pairs*, *Known Genes* und *STS/EST* verwendet. Abb. 4.3 zeigt beispielhaft ein Suchergebnis für das Gen *PTEN*.

FISH-kartierte oder vollständig sequenzierte Klone wurden bevorzugt ausgewählt.

4.2.3 Gewinnung der BAC/PAC-DNA

BACs mit einer CTB-Nummer entstammen der CITB-Datenbank (*Research Genetics, Invitrogen*, Karlsruhe, D). Alle anderen Klone (BACs: RP11, PACs: RP5) erhielten wir vom RZPD (*Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH*, Berlin, D). Aus

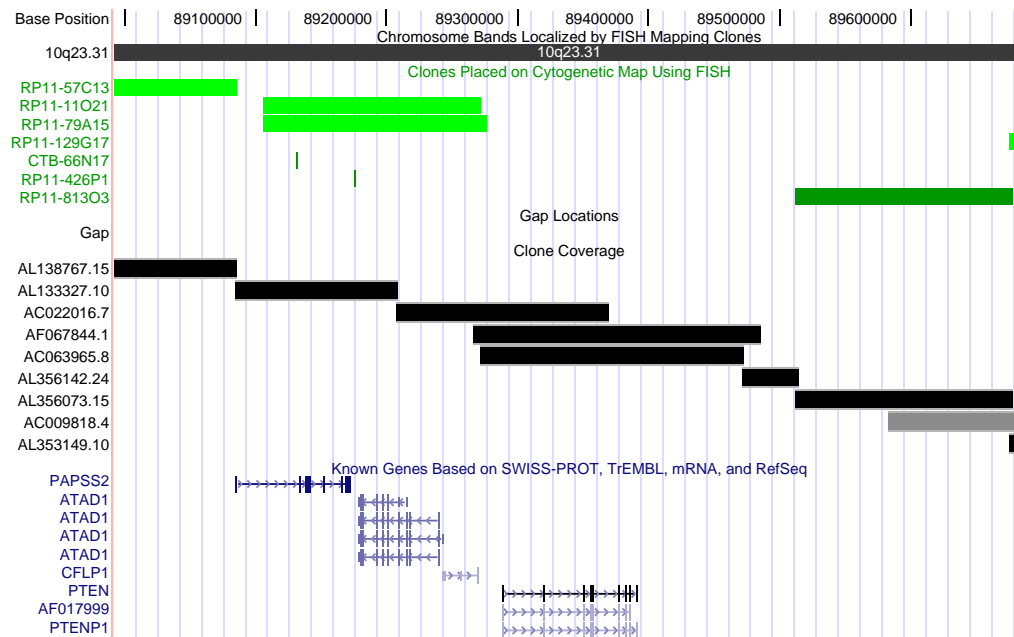


Abb. 4.3: Suchergebnis für die Genregion um *PTEN* im *UCSC Genome Browser*, Version Juli 2003. In die Suchmaske wurde *PTEN* eingegeben und für die Ergebnisanzeige die Optionen *Base Position*, *Chromosome Band*, *Clone Coverage*, *FISH Clones* und *Known Genes* ausgewählt. Oben in der Abbildung werden die Basenposition (*Base Position*) und die zytogenetische Bande (*Chromosome Bands*) angegeben. FISH-kartierte Klone (*Clones Placed on Cytogenetic Map Using FISH*) sind in grün dargestellt. Vollständig sequenzierte und auf Grund der Sequenz kartierte Klone (*Clone Coverage*) sind schwarz dargestellt. Die bekannten Gene (*Known Genes*) der Region sind blau dargestellt. Folgende Klone wurden für diese Arbeit ausgewählt: RP11-57c13 (AL138767.15), RP11-77f13 (AL133327.10), RP11-380g5 (AC063965.8), RP11-765c10 (AL356142.24) und RP11-165m8 (AC022016.7).

den gelieferten *Escherichia coli*-Stichkulturen wurden durch Vereinzelungsausstriehe auf LB-Agar (LB-Medium, 1,5 % Bacto-Agar) mit den Endkonzentrationen von 12,5 µg/ml Chloramphenicol (*Sigma*, Deisenhofen, D) für BAC-Klone bzw. 10 µg/ml Kanamycin (*Sigma*) für PAC-Klone und Übernacht-Kultur bei 37 °C Einzelkolonien erzeugt. Durch DNA-Mini-Präparation von jeweils drei Einzelkolonien pro Klon und anschließendem Verdau durch eine Restriktionsendonuklease wurden die gelieferten Bakterienkulturen auf eine eventuelle Kontamination mit anderen Klonen überprüft. Anschließend erfolgte die Maxi-Präparation und FISH-Kartierung.

Mini-Präparationsprotokoll: Pro Klon wurden von drei Einzelkolonien je 3 ml LB-Flüssigkulturen (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,5) mit den oben angegebenen Antibiotikakonzentrationen angelegt und über Nacht bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 6 min bei 14.000 rpm pelletiert und auf Eis in 200 µl Lösung 1 (10 mM EDTA) resuspendiert. Nacheinander wurden je 200 µl Lösung 2 (1 % SDS, 0,2 N NaOH) und 3 (1,875 M KOAc, 1/8,7 Vol Eisessig) zugegeben, jeweils gut gemischt und für 10 min inkubiert. Die Abtrennung vorhandener Schwebstoffe erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm. Die DNA im Überstand

wurde durch Fällung mit dem 0,7fachen Volumen Isopropanol für 20 min bei -20 °C und anschließender Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C gewonnen, mit 0,5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und in 20 μ l Elutions-Puffer (*Qiagen*) gelöst.

Restriktionsverdau: Der Verdau von 5 μ l Minipräp-DNA fand nach Zugabe von 2 μ l SuRe/Cut Puffer H (*Roche*), 12,5 μ l H₂O und 0,25 μ l Eco RI (10 U/ μ l; *Boehringer*, Mannheim, D) für 60 min bei 37 °C statt. Die DNA-Fragmente wurden in einem 0,8%igem Übernacht-Agarosegel analysiert. Stimmte das Bandenmuster aller drei Einzelkolonien im Gel überein, wurde der Klon weiterverwendet und von einer der Einzelkolonien eine Glycerolstockkultur angelegt. Wenn es sich um einen Mischklon handelte und sich die Bandenmuster aller drei Kolonien unterschieden, wurde der Klon ausgeschlossen. Differierte nur das Muster einer der Kolonien, dann wurde mit einer der identischen Kolonien weitergearbeitet.

Glycerolstockkultur: Zweimal 500 μ l einer LB-Übernacht-Kultur wurden mit jeweils 500 μ l 100%igem Glycerol gut durchmischt und bei -80 °C aufbewahrt.

Maxi-Präparationsprotokoll: Die Anzucht der Klone erfolgte über Nacht in 200 ml TB-Medium-Schüttelkultur (12 g/l Bactotrypton, 24 g/l Hefe-Extrakt, 4 ml/l Glycerin, 0,017 M KH₂PO₄, 0,072 M K₂HPO₄) mit den entsprechenden Antibiotikakonzentrationen bei 37 °C und 300 rpm. Das durch Zentrifugation für 5 min bei 6.000 rpm gewonnene Pellet wurde auf Eis in 20 ml Lösung I (10 mM EDTA) vollständig resuspendiert. Danach wurde zügig 40 ml Lösung II (2 N NaOH, 1 % SDS) zugegeben, für 5 bis 10 min inkubiert, 30 ml eiskalte Lösung III (1,875 M KOAc, 115 ml/l Eisessig) zugegeben und für weitere 15 min inkubiert. Es folgten zwei Zentrifugationsschritte, jeweils für 15 min, bei 10.000 rpm und mit Weiterführung des Überstands. Nach Fällung mit dem 0,7fachen Volumen Isopropanol und Zentrifugation für 15 min bei 5.000 rpm wurde das Pellet in 8 ml Lösung IV (10 mM Tris, 50 mM EDTA) aufgenommen. Danach wurde 4 ml Lösung V (7,5 M KOAc) zugegeben, 30 min auf -80 °C gekühlt und anschließend 10 min bei 7.000 rpm zentrifugiert. Die DNA im Überstand wurde durch Zugabe von 24 ml 100%iges Ethanol und Zentrifugation für 10 min bei 3.500 rpm präzipitiert und in 700 μ l Lösung VI (50 mM Tris, 50 mM EDTA) aufgenommen. Zehn μ l RNase (10 mg/ml; *Roche*) wurden zugegeben und der Verdau bei 37 °C für 1 h durchgeführt. Es folgte eine zweimalige Phenol-Chloroform- und einmalige Chloroformextraktion. Anschließend wurde die DNA mit dem 0,7fachen Volumen Isopropanol für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C gefällt, mit 200 μ l 70%igem Ethanol gewaschen und über Nacht in 200 μ l Elutions-Puffer (*Qiagen*) gelöst. Durch Zugabe von 20 μ l Natriumacetat (3 M) und 550 μ l 100%iges Ethanol, Inkubation für 20 min bei -80 °C und Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm wurde die

Tab. 4.2: BAC/PAC-Klone

Gen	genomische Localisation	Klone-ID	Gen	genomische Localisation	Klone-ID
<i>TP73</i>	1p36.3	RP11-62m23 RP5-1092a11 RP5-897i12	<i>PTEN</i>	10q23.3	RP11-839m4 RP11-298k13 RP11-380g5 RP11-765c10 RP11-165m8
<i>CDKN2C</i>	1p32	RP11-296a18 RP11-116m11 RP11-278j17	<i>TP53</i>	17p13.1	RP11-199f11 RP11-1d5
<i>GAC1</i>	1q32.1	RP11-148k15 RP11-23i7 RP11-155f3	<i>GRLF1</i>	19q13.3	RP11-492P7 RP11-631p20 RP11-183o14
<i>MET/</i> <i>HGFR</i>	7q31.2	CTB-300c3 CTB-13n12		21q11.2	RP11-61a21 RP11-89h16 RP11-22d1
<i>PTEN</i>	10q23.3	RP11-77f13 RP11-813o3			

Die **fettgedruckten** Klone wurden für den Methodenvergleich verwendet, alle anderen für die Interphase-FISH-Untersuchung an Gliomen.

DNA erneut gefällt, anschließend für 15 min mit 70%igem Ethanol bei 13.000 rpm gewaschen und schließlich in 200 μ l Elutions-Puffer (*Qiagen*) aufgenommen. Die DNA wurde bei 4 °C aufbewahrt.

Kartierung und Ausschluss von Kreuzhybridisierungen: Um die Lokalisation der DNA-Sonden im Genom zu überprüfen und Kreuzhybridisierungen auszuschließen, wurden je 500 ng DNA in einer Nicktranslation (siehe 4.3.1) mit Biotin-dUTP markiert und auf mit DAPI gegengefärbte, normale Metaphasechromosomen hybridisiert (siehe 4.4).

Etwa 20 % der bestellten Klone kartierten nicht auf den richtigen Genort oder waren Mischklone; diese wurden nicht weiter berücksichtigt. Die für die Interphase-FISH-Analyse (siehe 4.6) und den Methodenvergleich (siehe 4.5) verwendeten Klone sind in Tab. 4.2 zusammengefasst.

4.2.4 Auswahl und Herstellung der Zentromersonden

Wegen der durchschnittlich guten Signalintensität sollten für die Kontrollmarker Chromosom 21 und 18 Zentromersonden genutzt werden. Dies war aber auf Grund von Kreuzhybridisierungen nur für Chromosom 18 möglich. Für Chromosom 21 wurden deshalb BAC-Klone eingesetzt.

Alpha-Satelliten-PCR: Für die Herstellung der Zentromer-DNA wurden 200 ng DNA verwendet, die aus somatischen Mensch-Nager-Zellhybriden (Lengauer et al. 1994)

Tab. 4.3: Programm Alpha-Satelliten-PCR

Schritt	Temperatur in °C	Zeit
1	94	2 min
2	94	40 sec
3	50	1 min
4	72	2 min
5	Zurück zu 2, danach 24 x Wiederholung	
6	72	5 min
7	4	
8	Ende	

Tab. 4.4: Sondensets für die Interphase-FISH-Untersuchung an Gliomen

	Set 1	Set 2	Set 3
Sonde mit grüner Fluoreszenz	1p36.3 (o)	10q23.3 (a)	1p32 (o)
Sonde mit roter Fluoreszenz	19q13.3 (o)	7q31.2 (a)	17p13.1 (a)
Sonde mit Fluoreszenz nahe dem Infrarotbereich	21q11.2 (k)	cen18 (k)	1q32 (k/a)

Abkürzungen: o = oligodendroglialer Marker, a = astrozytärer Marker, k = Kontrollmarker

isolierte wurde. Der 50 μ l-Reaktionsansatz bestand aus H₂O, 20 μ l 5xPCR-Puffer D (*In-vitrogen*), 10 μ l 10 mM dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; *Boehringer*), je 1 μ l (100 μ M) Primer Alpha 1 (5'-GAAGCTTA(A/T)(C/G)T(C/A)ACAGAGTT(G/T)AA-3') und Alpha 2 (5'-GCTGCAGATC(A/C)C(A/C)AAG(A/T/C)AGTTTC-3') (*MWG-Biotech*, Ebersberg, D) und 1 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l; *GeneCraft*, Lüdinghausen, D). Die PCR-Maschine wurde wie in Tab. 4.3 programmiert.

4.2.5 Erstellen der Sondensets für die Interphase-FISH-Analyse

Ich stellte drei Sets bestehend aus jeweils drei Sonden (zwei Tumormarker und ein Kontrollmarker) nach tumorgenetischen Gesichtspunkten zusammen (Tab. 4.4). Im Set 1 wurden die oligodendroglialen Marker, im Set 2 die astrozytären Marker, und im Set 3 jeweils ein oligodendroglialer und ein astrozytärer Marker kombiniert. Pro Sonde wurde jeweils ein Pool aus drei bzw. zwei BAC-Klonen verwendet (siehe Tab. 4.2)

4.3 Markierung der DNA

Die DNA-Sonden für die FISH-Experimente wurden enzymatisch markiert, wobei zwischen direkter und indirekter Markierung unterschieden wird. Während bei der direkten Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Nukleotide eingebaut werden, die eine weitere Darstellung des Signals erübrigen, werden bei der indirekten Markierung mit

Tab. 4.5: Darstellung der pro 100 μ l-Nicktranslationsansatz verwendeten Deoxynukleotid-Derivate

	grüne Fluoreszenz	rote Fluoreszenz	Fluoreszenz nahe Infrarot
Direktmarkierung	6 μ l FITC-dUTP (1:10), 0,1 mM (<i>Boehringer</i>)	4 μ l Tamra-dUTP (1:4), 0,1 mM (<i>Applied Biosystems</i> , Darmstadt, D)	5 μ l Cy5-dUTP (1:10), 1 mM (<i>Amersham Bioscience</i>)
	6 μ l A488-dUTP (1:10), 0,1 mM (<i>Molecular Probes</i>)	6 μ l TR-dUTP (1:5), 0,2 mM (<i>Molecular Probes</i>)	
	6 μ l R110-dUTP (1:10), 0,1 mM (<i>Applied Biosystems</i>)	6 μ l SO-dUTP (1:10), 0,1 mM (<i>Vysis Inc.</i>)	
indirekte Markierung	4 μ l Biotin-dUTP, 1 mM (<i>Roche</i>)	4 μ l Digoxigenin-dUTP, 1 mM (<i>Boehringer</i>)	

Die jeweiligen Verdünnungen der verwendeten Stammlösungen der Nukleotide stehen in Klammern. Abkürzungen: FITC = *Fluorescein-isothiocyanat*, A488 = *Alexa 488*, R110 = *Rhodamin 110*, TR = *TexasRed*, SO = *SpectrumOrange*.

Haptenen (Biotin und Digoxigenin) gekoppelte dUTPs verwendet, die nach der Hybridisierung mit Avidin- bzw. Antikörper-konjugierten Farbstoffen immunzytochemisch detektiert werden.

4.3.1 Nicktranslation

Bei der Nicktranslation setzt das Enzym DNase I beliebige Einzelstrangbrüche (*nicks*), was einer DNA-Polymerase, erlaubt, vom *nick* ausgehend, Nukleotide zu entfernen und, unter Einbau von Haptenen oder direkt markierten Nukleotiden, einen neuen Strang zu synthetisieren. Gleichzeitig wird die hochmolekulare DNA in kürzere Fragmente zerlegt. Die DNase-Konzentration muss an Ausgangslänge und Qualität der Sonden-DNA angepasst werden, um einen optimalen Kompromiss zwischen akzeptabler Fragmentlänge und hoher Nukleotideinbaurate zu erzielen (Sambrook und Russell 2001). Für eine CGH-Untersuchung wurden jeweils 2 μ g Kontroll- und Tumor-DNA, bzw. 20 μ l aus einer primären PCR, in eine Nicktranslation eingesetzt. Für ein FISH-Experiment wurden 50-2000 ng BAC-DNA bzw. 5 μ l eines primären PCR-Ansatzes verwendet. Ein 100 μ l-Ansatz enthielt H₂O, 10 μ l 10xNT-Puffer (0,5 M Tris pH 7,5-8,0, 50 mM MgCl₂, 0,5 mg/ml BSA), 10 μ l 10xdNTP (jeweils 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 μ l β -Mercaptoethanol (0,1 M), DNA und das jeweilige Deoxynukleotid-Derivat (siehe Tab. 4.5).

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert, gemischt und mit 2 μ l Polymerase 1 (*Roche*) sowie DNase I (*Roche*) versetzt. Für die Nicktranslation von genomischer DNA für die CGH wurden zwischen 5 μ l DNase (1:500) (für DNA aus Paraffinmaterial oder aus einer PCR) und 36 μ l DNase (1:500) (für DNA aus nativen Zellen: Lymphozyten, Zelllinie SKBR3)

Tab. 4.6: Programm Primäre DOP-PCR

Schritt	Temperatur in °C	Zeit
1	96	3 min
2	94	1 min
3	30	1 min 30 sec
4	72	2 min
5	Zurück zu 2, danach 7 x Wiederholung	
6	94	1 min
7	40	1 min
8	72	2 min
9	Zurück zu 6, danach 34 x Wiederholung	
10	72	5 min
11	4	
12	Ende	

eingesetzt. Für BAC-DNA wurden 3 bis 10 μl DNase (1:100) verwendet. Die Reaktion fand bei 15 °C für 90 min statt und wurde, nach Überprüfung der Fragmentlänge durch Auftragen von 1 μl Reaktionsprodukt auf ein 1%iges Agarosegel, durch Inkubation für 10 min bei 65 °C gestoppt. Es wurden Fragmentlängen zwischen 200-2000 bp erreicht.

4.3.2 Amplifizierung und Markierung von DNA mittels PCR

Fügt man einer PCR markierte Nukleotide hinzu, wird die DNA simultan amplifiziert und markiert. Sowohl für CGH mit genomischer DNA aus Paraffinmaterial und nativen Zellen (Kontroll-DNA aus Lymphozyten, Zelllinie SKBR3) als auch für FISH mit BAC-DNA wurde die Amplifizierung und Markierung von DNA mittels PCR eingesetzt. Bei allen PCRs wurde eine Leerkontrolle mitgeführt und auf Metaphasechromosomen hybridisiert.

4.3.3 Degenerierte Oligonukleotidprimer (DOP)-PCR

Die **primäre Amplifizierung** von 200 ng DNA fand in einem 50 μl -Ansatz statt. H_2O , DNA, 10 μl 5xPCR-Puffer D (*Invitrogen*), 4 μl 10 mM dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; *Boehringer*) und 1,5 μl DOP-Primer (100 μM , 5'-CCGACTCGAG NNNNNNATGTGG-3'; *MWG-Biotech*) wurden auf Eis pipettiert, gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde 0,5 μl SuperTaq-Polymerase (15 U/ μl , *CPG*, Schwalbach, D) hinzugegeben, erneut gemischt und die PCR gestartet (Tab. 4.6).

Markierungs-PCR (Label-DOP): Zur Markierung der DNA wurden in einen 50 μl -Ansatz gegeben: 1 μl Reaktionsprodukt der primären PCR, 10 μl 5xPCR-Puffer D, 2,5 μl ACG-Mix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP), 4 μl dTTP (1 mM), 1 μl Biotin-dUTP bzw.

Tab. 4.7: Programm *Label-DOP*

Schritt	Temperatur in °C	Zeit
1	94	3 min
2	94	1 min
3	56	1 min
4	72	30 sec
5	Zurück zu 2, danach 19 x Wiederholung	
6	72	5 min
7	4	
8	Ende	

Digoxigenin-dUTP, 1 μ l DOP-Primer (100 μ M), 30 μ l H₂O und 1 μ l Taq-Polymerase Biotherm (5 U/ μ l, *GeneCraft*). Die PCR-Programmschritte zeigt Tab. 4.7.

Für eine CGH-Hybridisierung wurde der gesamte Reaktionsansatz eingesetzt; für die Hybridisierung eines BACs auf Metaphasechromosomen wurden 5 μ l des Ansatzes verwendet.

4.3.4 Ligationsbasierte (LIG)-PCR

Um CGH an mikrodissiziertem Tumormaterial durchführen zu können, wurde das gesamte Eluat der DNA-Extraktion aus Paraffinmaterial mittels einer Vakuumzentrifuge auf etwa 2 bis 5 μ l reduziert und in die PCR eingesetzt. In allen anderen Reaktionen wurden 1 bzw. 200 ng DNA verwendet.

Primäre PCR: Zunächst erfolgte der DNA-Verdau mit der Restriktionsendonuklease Mse I (Schnittstelle T'TAA) bei 37 °C für 3 h in einem 5 μ l-Reaktionsansatz bestehend aus DNA, 0,2 μ l OPA-Puffer (*Amersham Bioscience*, München, D), H₂O und 0,5 μ l Mse I (10 U/ μ l; *New England BioLabs Inc.*, Frankfurt am Main, D) in einer PCR-Maschine. Anschließend wurde das Enzym bei 65 °C für 5 min inaktiviert. Nach Zugabe von je 0,5 μ l der Primer Lig21 (5'-AGTGGGATTCCGCATGCTAGT-3') und Lig12 (5'-TAACTAGCATGC-3') (*MWG-Biotech*), 0,5 μ l 10xOPA-Puffer und 1,5 μ l H₂O wurde der Ansatz mit einer Geschwindigkeit von 1 °C/min auf 15 °C abgekühlt, wobei die Primer eine Basenpaarung eingehen konnten. Die Ligation des Adapters aus den Primern Lig21 und Lig12 an die durch Mse I erzeugten 5' TA-Überhänge der DNA-Fragmente erfolgte durch Zugabe von je 1 μ l ATP (10 mM) und T4 DNA-Ligase (10 U/ μ l; *GeneCraft*) bei 15 °C über Nacht. Dabei wurde nur der Primer Lig21 kovalent gebunden; der zweite Primer bindet lediglich über Wasserstoffbrücken, da ihm das für die Ligation notwendige 5'-Phosphat fehlt. Nach Zugabe des PCR-Mixes aus 34 μ l H₂O, 3 μ l Puffer 1 (*Expand Long Template PCR System*; *Roche*), 2 μ l 10 mM dNTP-Mix und 1 μ l

Tab. 4.8: Programm Primäre LIG-PCR

Schritt	Temperatur in °C	Zeit
1	68	3 min
2	94	40 sec
3	57	30 sec
4	68	1 min 14 sec
5	Zurück zu 2, danach 13 x Wiederholung	
6	94	40 sec
7	57	30 sec
8	68	1 min 45 sec
9	Zurück zu 6, danach 33 x Wiederholung	
10	94	40 sec
11	57	30 sec
12	68	5 min
13	4	
14	Ende	

Tab. 4.9: Programm Label-LIG

Schritt	Temperatur in °C	Zeit
1	94	1 min
2	65	30 sec
3	72	2 min
4	94	40 sec
5	65	30 sec
6	72	1 min 30 sec
7	Zurück zu 4, danach 14 x Wiederholung	
8	94	40 sec
9	65	30 sec
10	72	2 min
11	Zurück zu 8, danach 8 x Wiederholung	
12	72	5 min
13	4	
14	Ende	

Primer Lig21 wurde zunächst der kürzere Primer Lig12 entfernt durch Inkubation für 4 min bei 65 °C. Anschließend wurde der Polymerase-Mix (*Expand Long Template PCR System*; Roche) zugegeben und die PCR gestartet (Tab. 4.8). Schritt 1 diente dabei der Auffüllung der 3' rezessiven Enden der Fragment-Adapter-Konstrukte, so dass eine komplementäre Lig21-Primerbindungsstelle entstand.

Markierungs-PCR (*Label-LIG*): Ein 30 µl-Ansatz zur DNA-Markierung enthielt 0,5 µl des primären PCR-Produkts, 6 µl 5xPCR-Puffer D, 1 µl 6/7-dNTPs (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, 8,6 mM dTTP), 1,3 µl Biotin-dUTP bzw. Digoxigenin-dUTP, 0,5 µl Primer Lig21, 20,2 µl H₂O und 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl; *GeneCraft*). Tab. 4.9 zeigt das PCR-Programm.

Von der Markierungs-PCR von genomischer DNA wurde der gesamte Ansatz für eine CGH-Hybridisierung verwendet, für eine Hybridisierung von BAC/PAC-DNA wurden 5 μ l des Ansatzes benutzt.

4.3.5 *Random Priming*

An denaturierte DNA binden kurze Primer zufälliger Sequenz (*Random-Hexamere*), von deren 3'-Ende die Polymerisierung ausgeht. Das Klenow-Fragment der Polymerase I besitzt keine 5'-3-Exonukleaseaktivität und verdaut somit die 5'-Enden der Primer nicht. Wie die Nicktranslation garantiert diese Methode die Markierung der gesamten DNA zu gleichen Anteilen, da die Hexamere in statistischer Verteilung binden. Der ursprüngliche Strang wird dabei nicht verändert, es resultiert eine Verdopplung der DNA, wobei die eine Hälfte von den synthetisierten, markierten DNA-Stücken, und die andere Hälfte von der unmarkierten Ausgangs-DNA gebildet wird.

Ursprünglich wurde das *HexaLabel Plus DNA Labelling Kit* (Fermentas, St. Leon-Rot, D) verwendet. Dazu wurde 1 μ g DNA mit H₂O und 10 μ l Random-Hexamerprimer (*Kit*) in 5xReaktionspuffer (*Kit*) in einem 30 μ l-Ansatz für 10 min bei 95 °C denaturiert. Nach Zugabe von je 5 μ l dATP, dCTP und dGTP (1 mM; *Kit*), 2,5 μ l dTTP (1 mM; *Kit*), 2,5 μ l Biotin-dUTP und 1 μ l Klenow-Enzym (5 U/ μ l; *Kit*) folgte die Inkubation über Nacht bei 37 °C. Das Enzym wurde durch Erhitzen auf 65 °C für 10 min inaktiviert.

Das Protokoll wurde so abgeändert, dass sich die Konzentration der Hexamerprimer auf das 1,5, 2 und 4fache erhöhte. Dafür wurden die Hexamerprimer des *Kits* teilweise durch andere der Firmen *Roche* und *Fermentas* ersetzt. Die Reaktion wurde außerdem in mehreren Zyklen durchgeführt, wobei während der Inkubation wiederholt denaturiert und erneut Enzym zugesetzt wurde.

Als weitere Möglichkeit wurde, angelehnt an ein Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Donna Albertson, San Francisco (*UCSF Comprehensive Cancer Center*, San Francisco, CA, USA), sowohl die Primerkonzentration deutlich erhöht (etwa das 6fache des *Kits*), als auch die des Enzyms. Dafür wurden in einem 25 μ l-Ansatz 40 ng DNA mit 2,5 μ l 10xbuffer (500 mM Tris, 30 mM MgCl₂, 0,1 M β -Mercaptoethanol), 2 μ l l-dNTPs (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,5 mM dTTP), 2 μ l Biotin-dUTP und 15 μ l Hexamerprimer (0,2 μ g/ μ l; *First Strand cDNA Synthesis Kit*, *Fermentas*) denaturiert und anschließend 3,5 μ l Enzym hinzugegeben.

Ein DNase-Verdau des Reaktionsproduktes wurde bei 37 °C nach Zusatz von 10 μ l 10xNT-Puffer, H₂O und 2 μ l DNase (1:100) durchgeführt.

Außerdem wurde mit DNase I verdaute DNA (siehe 4.3.6) in eine *Random Priming*-

Reaktion eingesetzt.

4.3.6 *TdT-mediated dUTP-X nick end labeling (TUNEL)*

Die TUNEL-Reaktion wird zur Detektion apoptose-spezifischer DNA-Degradierung verwendet. Das Enzym Terminale Desoxynukleotid-Transferase katalysiert die sequenzunabhängige Polymerisierung von dNTPs an freie 3'-OH-Enden von Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Bei Einsatz von Fluorochrom-konjugierten Nukleotiden wurde so enzymatisch markiert. Um diese Reaktion für die Markierung von BAC-DNA verwenden zu können, muss die DNA vorher auf die richtige Länge verdaut werden und 3'-Überhänge erzeugt werden.

Zunächst wurde das *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche)*, entsprechend dem Protokoll nach DNase I Verdau von 2 µg BAC-DNA erprobt. Des weiteren wurde die DNA mit DNase I bzw. Mse I verdaut und mit einem Protokoll nach den Angaben der Firma *Fermentas* markiert.

Für den Mse I-Verdau wurden in einem 50 µl-Reaktionsansatz 2 µg DNA, H₂O, 5 µl OPA-Puffer und 0,5 µl Mse I addiert. Der Verdau erfolgte bei 37 °C für 90 min. Die Fragmentlänge (300-600 bp) wurde im Gel überprüft und die Reaktion durch Erhitzen auf 65 °C für 10 min gestoppt.

Der DNase-Verdau fand bei 37 °C unter Einsatz von 2 µg DNA, 10 µl 10xNT-Puffer, H₂O und 8 µl DNase I (1:100) in einem 100 µl-Ansatz statt, bis eine Länge von 300-600 bp erreicht war. Es folgte die Inaktivierung der DNase bei 65 °C für 10 min.

Die verdaute DNA wurde mit Natriumacetat und 100%igem Ethanol gefällt, in 10 µl H₂O aufgenommen, und in die TUNEL-Reaktion eingesetzt. Der 40 µl-Ansatz enthielt DNA, H₂O, 8 µl 5xPufferTdT (*Roche*), 1 µl Biotin-dUTP (1 mM), 1 µl dTTP (1 mM), und 0,8 µl Terminale Desoxynukleotid-Transferase (TdT) (25 U/µl; *Roche*) bzw. 1 µl TdT (20 U/µl; *Fermentas*). Die Reaktion fand bei 37 °C für 6 h bzw. 3 h statt. Nach Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min wurde die Länge der DNA nochmals im Gel kontrolliert.

Als weitere Varianten wurden die Verhältnisse von Biotin-dUTP zu dTTP (1:1 und 1:6) verändert und statt dTTP ein Nukleotidgemisch (6/7-Mix) eingesetzt. Außerdem wurde auch ausschließlich Biotin-dUTP in eine TUNEL-Reaktion eingesetzt. Durch Einsatz von 0,5 µl Mse I in eine TUNEL-Reaktion mit ungeschnittener DNA sollte die Möglichkeit von Verdau und Markierung gleichzeitig getestet werden.

4.3.7 Chemische Markierung von DNA

Es wurden 2 Systeme getestet, das *ULYSIS Nucleic Acid Labeling Kit* (*Molecular Probes; Invitrogen*) zur nichtenzymatischen Markierung und der *ARES DNA labeling Kit* (*Molecular Probes*) zur halbenzymatischen Markierung jeweils mit Alexa Fluor 488 (Anregungs- und Emissionsbereich wie FITC) und Alexa Fluor 594 (entspricht *Texas-Red*).

Für die chemische Markierung mit *ULYSIS* wurde 1 µg DNA dem Protokoll entsprechend mit DNase I verdaut, gefällt und in die Reaktion eingesetzt.

Der Markierung mit dem *ARES DNA Labeling Kit* funktioniert in zwei Schritten: Protokollgemäß fand zunächst der enzymatische Einbau von 5-(3-aminoallyl)-dUTPs in die DNA mittels Nicktranslation statt. Anschließend wurde die modifizierte DNA mittels *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen*) gereinigt, gefällt, gelöst und denaturiert. Danach fand die chemische Reaktion mit dem Amino-reaktiven Farbstoff statt. Zuletzt wurde die DNA nochmals mit dem *Kit* gereinigt.

Zusätzlich wurde BAC-DNA zur chemischen Markierung an die Firma *Kreatech* (Amsterdam, Niederlande) geschickt, auf deren Patent der *ULYSIS-Kit* basiert.

4.3.8 Rolling Circle Amplification

Die Polymerase des Bakteriophagen Phi29 katalysiert die Polymerisation von zirkulärer DNA. Dabei dienen *Random*-Hexamerprimern als Ausgangspunkte. Während der DNA-Synthese wird jeweils das 5'-Ende des downstream entstehenden Stranges verdrängt. An die so produzierten einzelsträngigen Konkatemere können sich wiederum Hexanukleotide anlagern und einen Gegenstrang primen. Kontinuierliche Elongation und Strangverdrängung resultieren in einem stark verzweigten Molekül. Aus wenigen Pikogramm Ausgangsmaterial wird DNA hochkomplexer Struktur im Mikrogramm-Bereich produziert (Dean et al. 2001).

Zunächst wurden 100 pg bzw. 10 ng BAC-DNA mit dem *TempliPhi DNA Sequencing Template Amplification Kit* (*Amersham Biosciences*) nach dem mitgelieferten Protokoll amplifiziert und das Reaktionsprodukt mittels Nicktranslation markiert.

Zur simultanen Markierung wurde Biotin-dUTP zu dem *Kit* gegeben: Zehn Nanogramm BAC-DNA wurden in 5 µl sample-Puffer (*Kit*) aufgenommen, 3 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 5 µl Reaktions-Puffer (*Kit*), 0,5 µl Biotin-dUTP (*Roche*) und 0,2 µl Polymerase (*Kit*) fand die Reaktion über Nacht bei 30 °C statt. Es folgte die Inaktivierung des Enzyms bei 65 °C für 10 min. Das

Produkt wurde mit DNase I verdaut.

Ein eigener Reaktionsansatz wurde wie folgt durchgeführt: Nach Denaturierung der DNA (siehe oben) wurden 0,5 μ l RCA-Puffer (500 mM Tris, 100 mM MgCl₂, 2 mg/ml BSA), 0,5 μ l Biotin-dUTP, 1 μ l RCA-dNTPs (je 2 mM ACG, 1,5 mM T), 2,5 μ l Hexamerprimer (0,2 μ g/ μ l; *Fermentas*), 0,5 μ l H₂O und 0,2 μ l Enzym (*Kit*) zugegeben. Die Reaktion fand wie oben beschrieben mit anschließendem DNase-Verdau statt.

4.3.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die aus den beschriebenen Methoden (siehe 4.3.1-4.3.8) resultierenden DNA-Längen wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Jeweils 2 μ l des Reaktionsprodukts wurden mit 1 μ l Gelladepuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 15 % Ficoll) versetzt, auf ein 1%iges Agarosegel, versetzt mit 4 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 100 ml Gelmix, gegeben und zusammen mit 1 μ l Längenstandard (20 μ l Gellade-Puffer, 10 μ g 100 bp-DNA-Längenstandard; *Fermentas*) bei 120 V für 30 min aufgetrennt. Das Gel wurde unter einem UV-Schirm mit einem Gel-Photodokumentationssystem (*MWG Biotech*) digitalisiert.

4.4 FISH-Technik

Alle Hybridisierungen dieser Arbeit richteten sich grundsätzlich nach einem FISH-Protokoll, welches hier beschrieben wird. Die für die verschiedenen Methoden notwendigen Abwandlungen finden sich in den entsprechenden Abschnitten (4.6-4.7).

Sowohl die Target- als auch die Sonden-DNA wurden zunächst denaturiert (einzelssträngig gemacht), um dann miteinander zu hybridisieren. Zwischengelagerte repetitive DNA-Sequenzen wurden vor der Hybridisierung mittels *C₀t*-1-DNA möglichst vollständig in der Sonde blockiert (Pinkel et al. 1988), um eine unspezifische Hybridisierung zu verhindern. Nach der Hybridisierung wurden überschüssige DNA-Sequenzen durch Waschschrirte entfernt. Anschließend wurden nicht fluoreszierende Haptenmoleküle detektiert, nachdem unspezifische Bindungsstellen im Target mittels Serum-Albumin abgedeckt wurden. Um das Ausbleichen der Fluoreszenzmarkierung während der Bildaufnahme zu verringern, wurden die Objektträger mit *Antifade* (10 mg/ml p-Phenyl-Diamine in 1xPBS/90 % Glycerol, pH 8,0) eingedeckt (Schröck et al. 1994).

4.4.1 Vorbereitung der Metaphasechromosom-Objektträger

Die Objektträger wurden kurz in 2 x SSC (aus 20 x SSC: pro Liter 175,3 g NaCl, 88,2 g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, pH 7,4) getaucht, mit 120 μ l RNase A-Lösung (20 mg/ml [*Roche*] 1:200 in 2 x SSC) und einem Deckglas von 24 x 60 mm² bedeckt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach drei Waschschritten von je 5 min in 2 x SSC folgte der Verdau des Zytoplasmas. Dazu wurden 4 bis 10 μ l Pepsin (100 mg/ μ l; *Sigma*) auf 100 ml 37°C warme HCl (0,01 M, pH 2,0) gegeben und die Objektträger 4 bis 10 min in dieser Lösung inkubiert. Die richtige Enzymkonzentration und Dauer des Verdaus wurden für jede Objektträger-Serie ermittelt und der Erfolg des Verdaus nach Benetzten der Objektträger mit 1 x PBS (aus 10xPBS: pro Liter 20 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na_2HPO_4 , 2,4 g KH_2PO_4 , pH 7,0) im Phasenkontrastmikroskop überprüft. Die Mehrzahl der Chromosomen und Kerne sollte matt grau erscheinen. Es folgten zwei Waschschriffe von je 5 min in 1 x PBS, ein Waschschriff für 5 min in PBS/MgCl₂ (0,05 M MgCl₂ in 1 x PBS) und ein Fixierungsschriff für 10 min in PBS/MgCl₂ plus 1 % Formaldehyd. Nach erneutem Waschen für 5 min in 1 x PBS und Trocknen in einer aufsteigenden Ethanolreihe wurden die Objektträger mit 120 μ l Denaturierungslösung (70 % Formamid/2 x SSC, pH 7,0) und einem 24 x 60 mm² Deckglas eingedeckt. Für die Denaturierung wurden die Objektträger auf einer Heizplatte für 90 sec auf 74°C erhitzt, anschließend sofort in eiskaltes 70%iges Ethanol gegeben, danach für jeweils 3 min in 90- und 100%iges Ethanol dehydriert und luftgetrocknet.

4.4.2 Fällung der DNA und Hybridisierung

Die markierte DNA wurde gemeinsam mit 10 μ l *C₀t*-1-DNA (1 μ g/ μ l; *Roche*) pro 1 μ g DNA und 1 μ l Lachssperma-DNA (10 mg/ml; *Sigma*) durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M) und dem 2,5 bis 3,0fachen Volumen eiskalten, 100%igen Ethanols für 30 min bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C wurde das Pellet mit 500 μ l 70%igem Ethanol für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C gewaschen und nach Entfernung des Überstandes luftgetrocknet. Je nach Größe des später verwendeten Deckglases wurde die DNA in 6 μ l Hybridisierungsmix (1/2 Vol deionisiertes Formamid, 20 % Dextransulfat in 2 x SSC, pH 7,0) für ein rundes Deckglas (d = 10 mm) bzw. 12 μ l Hybridisierungsmix für ein 18 x 18 mm² großes Deckglas aufgenommen und langsam schüttelnd bei 37°C gelöst. Die Denaturierung fand für 5 bis 8 min bei 80°C statt. Während der folgenden Inkubation bei 37°C, je nach Komplexität der DNA zwischen 30 min (*BAC*-DNA) und 2 h (genomische DNA), wurde die *C₀t*-1-DNA

Tab. 4.10: Übersicht über die zur Detektion nach CGH eingesetzten Nukleotide, Haptene, Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

detektiertes Nukleotid	Biotin-dUTP (resultiert in grüner Fluoreszenz)	Digoxigenin-dUTP (resultiert in roter Fluoreszenz)
1. Schicht	Avidin-FITC (1,8 mg/ml; <i>Jackson ImmunoResearch</i> , Suffolk, GB)	<i>mouse-anti-Digoxigenin-AK</i> (1,2 mg/ml; <i>Jackson</i>)
2. Schicht	Biotin- <i>anti</i> -Avidin (0,5 mg/ml; <i>Vector Laboratories</i> , Gruenberg, D)	TR- <i>rabbit-anti-mouse-AK</i> (1,4 mg/ml; <i>Jackson</i>)
3. Schicht	Avidin-FITC (1,8 mg/ml; <i>Jackson</i>)	TR- <i>donkey-anti-rabbit-AK</i> (1,5 mg/ml; <i>Jackson</i>)

Abkürzungen: AK = Antikörper, FITC = Fluorescein-isothiocyanat, TR = *TexasRed*

mit den für die Hybridisierung störenden repetitiven Sequenzen der markierten DNA hybridisiert. Die so vorbereitete DNA wurde auf die denaturierten Objektträger gegeben, mit einem Deckglas versehen, mit Montagekleber (*Fixogum*; Marabu, Tamm, D) verschlossen und in einer feuchten Kammer 24 bis 48 h hybridisiert. Nach Entfernung der Versiegelung und der Deckgläser wurden die Objektträger je dreimal 5 min in 45 °C warmem FA/SSC (50 % Formamid in 2 x SSC, pH 7,0) und in 60 °C warmen 0,1 x SSC gewaschen.

4.4.3 Detektion

Die Objektträger wurden kurz mit 45 °C warmen 4 x SSC/0,1 % Tween 20 befeuchtet und mit 120 µl Blockierungslösung (3 % BSA in 4 x SSC/Tween 20) unter einem 24 x 60 mm² Deckglas für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reagenzien einer Detektionsschicht (Tab. 4.10) wurden zunächst bei 13.000 rpm für 3 min zentrifugiert, aus den Überständen eine gemeinsame 1:200 Verdünnung in 4 x SSC/Tween 20 angefertigt und davon je 120 µl auf die Objektträger aufgetragen. Nach einer Inkubation von 30 min folgten drei Waschschrte von je 5 min in 4 x SSC/Tween 20. Anschließend wurde die nächste Schicht aufgebracht und in gleicher Weise inkubiert und gewaschen.

Die Anfärbung zur Chromosomenbänderung bzw. der Interphasekerne geschah in einer DAPI-Lösung (1 µg 4',6-Diamidino-2-phenylindole auf 100 ml 2 x SSC) bei Raumtemperatur für 10 min. Anschließend wurden die Objektträger 5 min in H₂O gewaschen, in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, luftgetrocknet und mit 30 µl *Antifade* und einem Deckglas bedeckt. Die Objektträger wurden bis zur Aufnahme lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

4.4.4 Bildaufnahme

Digitalisierte Bildserien (*Image Stacks*) wurden mittels einer gekühlten CCD- (*charge-coupled device*) Kamera (Quantix, *Photometrics*, Roper Bioscience Systems, Tucson, AZ, US) an einem DM RXA-Epifluoreszenzmikroskop (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Deutschland) mit den entsprechenden Bandpass-Filtern für DAPI-, FITC-, Cy5-, TR- und TRITC-Emissionen, unter Verwendung der *Software* CW4000, Version V3.0 (*Leica*, Cambridge, GB), aufgenommen.

4.5 Optimierung und Vergleich der Markierungsmethoden

Jeweils ein Pool aus drei BAC-Klonen der Region 10q23.3 (RP11-77f13, RP11-813o3, RP11-839m4) und ein einzelner Klon dieser Region (RP11-77f13) (siehe Tab. 4.2) wurden ausgewählt und mittels der verschiedenen Methoden (siehe 4.3) mit Biotin-dUTP markiert, für 24 h auf Metaphasechromosomen hybridisiert (siehe 4.4.2) und mit einer Schicht eines Fluorochroms, z. B. Avidin-FITC detektiert (siehe 4.4.3).

Um den Einfluss von intra- und interexperimentellen Variablen ausschließen zu können, wurde als Referenz in jedem Experiment eine mittels Nicktranslation markierte Probe mitgeführt. Die Belichtungszeiten für die *Image Stacks* (siehe 4.4.4) mit dem DAPI- und FITC-Filter entsprach derjenigen der Referenz. War die Signalintensität zu schwach, wurden zusätzlich Aufnahmen mit höheren Belichtungszeiten durchgeführt. Die Fluoreszenzintensitätswerte (*RI*, *raw intensity*) der aufgenommenen Bilder wurden in der Aufnahme-*Software* abgelesen; die *RI*-Werte von mindestens 20 Signalen auf Kernen und Chromosomen, sowie des Hintergrunds auf Kernen, Chromosomen und auf dem Objektträger wurden verglichen.

4.6 Interphase-FISH-Untersuchungen von Paraffinmaterial

4.6.1 Behandlung der Paraffinschnitte

Die Paraffinschnitte wurden durch dreimaliges Inkubieren in 100%igem Xylol für je 10 min entparaffiniert und anschließend zweimal 5 min in 100%igem Ethanol gewaschen. Die luftgetrockneten Schnitte wurden bei Raumtemperatur für 60 min in HCl (0,2 N) vorverdaut. Nach Rehydrierung für 3 min in H₂O wurden die Objektträger mit NaSCN (1 M) eingedeckelt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 2 x SSC für je 5 min fand der Gewebeverdau statt. Dazu wurde eine Pepsinlösung (2 mg/ml [*Sigma*] in 0,9%igem NaCl, pH 1,5) hergestellt und auf 37 °C erhitzt. Alternativ

Tab. 4.11: Detektionsschichten für die Interphase-FISH-Analyse

Markierung	Biotin-dUTP (resultiert in grüner Fluoreszenz)	Tamra-dUTP (rote Fluoreszenz)	Digoxigenin-dUTP (resultiert in Fluoreszenz nahe Infrarot)
1. Schicht	Avidin-FITC (1:200)	-	<i>mouse-anti-Digoxigenin</i> (1:200)
2. Schicht	-	-	<i>Cy5-goat-anti-mouse</i> (1:200)

wurde der Verdau mit Proteinase K (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [*Merck*] in Tris-HCl (0,05 M, pH 7,5) und Kollagenase (390 U in 4 ml; [*Sigma*]) getestet. Da der Verdau der kritische Schritt für das Gelingen der Hybridisierung war, wurde er für jeden einzelnen Objektträger individuell durchgeführt. Der Fortgang wurde alle zwei bis fünf Minuten unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Es sollte möglichst viel Gewebe entfernt werden, ohne die Kerne selbst anzugreifen. Die Zeiten für den Verdau lagen zwischen 10 und 60 min mit Pepsin, 5 und 20 min mit Proteinase K und 10 und 15 min mit Kollagenase. Kombinationen der drei Möglichkeiten wurden getestet. Die Objektträger wurden wie unter 4.4.1 beschrieben weiterbehandelt. Die Denaturierung wurde jedoch zweimal für je 3 min durchgeführt.

4.6.2 Markierung der Sonden

Zwei Mikrogramm gepoolte DNA einer Sonde bzw. 2 μl der Alpha-Satelliten-PCR des Zentromers 18 wurden mittels Nicktranslation (siehe 4.3.1) mit Biotin-dUTP (resultiert in grüner Fluoreszenz), Tamra-dUTP (resultiert in roter Fluoreszenz) bzw. Digoxigenin-dUTP (resultiert in Fluoreszenz nahe dem Infrarotbereich) markiert. Die Länge der DNA wurde auf 300 bis 600 bp eingestellt.

4.6.3 Hybridisierung

Die drei Sonden eines Sets wurden, mit Ausnahme der Zentromersonde, wie unter 4.4.2 beschrieben, gemeinsam mit 50 μl C_0t -1-DNA gefällt, in 12 μl Hybridisierungsmix aufgenommen, für 5 min denaturiert und 30 min inkubiert. Die Zentromersonde wurde ohne C_0t -1 DNA gefällt, für 5 min denaturiert und anschließend sofort zu den entsprechenden inkubierten Sonden gegeben und hybridisiert. Die Hybridisierung wurde für 48 h durchgeführt.

4.6.4 Detektion

Die Detektion fand wie unter 4.4.3 beschrieben mit den Detektionsreagenzien der Tab. 4.11 statt.

4.6.5 Bildaufnahme

Unter Zuhilfenahme der HE-Schnitte wurden die entsprechenden Regionen auf den hybridisierten Schnitten unter dem DAPI-Filter aufgesucht. Mit dem 40er Objektiv wurden je nach Qualität der Hybridisierung zwischen 6 und 20 *Image Stacks* mit der Multi-Fokus-Funktion der FISH-Software CW 4000 aufgenommen. Zur Berechnung jedes Einzelbilds digitalisierte die Kamera eine Fokustiefe von 6 bis 8 μm in 0,5 μm Schritten. Die Fokustiefe wurde für jedes Bild erneut ausgewählt, um sicherzustellen, dass alle Signale aus den dreidimensionalen Zellkernen erfasst wurden. Die DAPI-Färbung diente der Identifizierung der Zellkerne. Die Abspeicherung der Bilder im 16 bit-TIFF-Format ermöglichte die nachträgliche Bearbeitung der Bilder ohne Informationsverlust.

4.6.6 Auswertung

Für jede Region wurden die Signale aus 200 Kernen von zwei unabhängigen Untersuchern (Barbara Klink und Ben Schlingelhof bzw. Martin Klink) ausgezählt. Dabei wurden Doppel-Signale, bedingt durch die unterschiedliche dreidimensionale Anordnung des Chromatins entsprechend der Zellteilungsphasen (Schubert et al. 2002), als ein Signal gewertet. Es wurden ausschließlich Kerne einbezogen, die nicht überlappten und in jedem Filter mindestens 1 Signal aufwiesen. Die Konfidenzintervalle der Mittelwerte aus den Anzahlen der Signale pro Kern wurden berechnet und verglichen. Überschneiden sich die Konfidenzintervalle von Referenzmarker (Chromosomen 21 und 18) und Tumor-Marker, wurde der Marker als normal gewertet. Wenn sich die Konfidenzintervalle nicht überschneiden, wurde ein Verlust angenommen, wenn die Differenz der Konfidenzintervalle von Markersonde und Kontrolesonde negativ war, war sie positiv zählte der Marker als gewonnen. Die Konfidenzintervalle der gleichen Zählung durch die zwei unabhängigen Untersucher mussten sich überschneiden, sonst wurde die Zählung wiederholt. Außerdem entwickelte ich mit Ben Schlingelhof (Studentische Hilfskraft im Labor von Prof. Dr. E. Schröck) ein Programm, welches die Anzahl der verschiedenen Zellklone berechnet und in einem dreidimensionalen Diagramm darstellt. Dadurch wurde die Anzahl der verschiedenen Klone und der normalen Zellen im Tumorgewebe werden sowie an einer unveränderten Sonde die Anzahl der angeschnittenen Zellen abgeschätzt werden.

4.6.7 Hybridisierungs-Kontrolle

Zur Überprüfung der hergestellten Sonden und der Hybridisierungsqualität wurde bei jedem Hybridisierungsgang eine Kontrolle auf Metaphasechromosomen mitgeführt, Bilder

aufgenommen und nach folgenden Gesichtspunkten überprüft:

- Pro Zellkern mussten pro Spektralbereich jeweils zwei Signale erkennbar sein.
- die Sonden mussten an die richtigen Stellen auf den Metaphasechromosomen hybridisiert haben.
- Die Zentromersonde durfte keine Kreuzhybridisierungen aufweisen.

4.7 CGH-Analyse

4.7.1 Vorbehandlung der Metaphasechromosomen

Mit dem Phasenkontrastmikroskop wurden die Hybridisierungsareale auf den Metaphase-Objektträgern sorgfältig ausgesucht und diese wie unter 4.4.1 beschrieben behandelt. Metaphasechromosomen, Tumor- und Kontroll-DNA mussten immer von Personen gleichen Geschlechts sein.

4.7.2 Markierung der DNA

Für die Markierung der DNA wurden die Nicktranslation, die DOP-PCR und die LIG-PCR verwendet (siehe 4.3.1 und 4.3.2). Tumor-DNA wurde immer mit Biotin-dUTP markiert (resultierte in grüner Fluoreszenz) und Kontroll-DNA mit Digoxigenin-dUTP (resultierte in roter Fluoreszenz).

4.7.3 Hybridisierung

Wie unter 4.4.2 beschrieben, wurden Tumor- und Kontroll-DNA gemeinsam mit 50 μ l *C₀t*-1-DNA gefällt, in 12 μ l Hybridisierungsmix gelöst, 8 min denaturiert, 2 h inkubiert und für 48 h hybridisiert.

4.7.4 Detektion

Die Detektion erfolgte wie unter 4.4.3 beschrieben.

4.7.5 Bildaufnahme und Auswertung

Für jede Hybridisierung wurden mit dem 100er Objektiv Bilder von mindestens 15 Metaphasen aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mittels der *QCGH-Software* (Leica,

Cambridge, GB). Die invertierten DAPI-Bilder dienten der Chromosomenidentifizierung. Die Grenze für einen Gewinn wurde bei einem Fluoreszenzintensitätsverhältnis FITC/TR $>1,2$ festgelegt, für eine Amplifikation $>1,5$ und für einen Verlust bei $<0,8$.

4.8 Statistik

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 12.0 (*SPSS GmbH*, München, D). Stetige Variablen wurden zwischen den Gruppen mit dem *t*-Test (Alter, ANCA) und dem Mann-Whitney U-Test (ANCA) verglichen und als Mittelwert und 95-Prozent-Konfidenzintervall oder als Median und Spannweite angegeben. Der Vergleich kategorialer/nominaler Daten (Geschlecht, Therapie, Aberrationen) erfolgte für 2 Gruppen mit dem Fisher-Exakt-Test. Wurden mehr als 2 Gruppen verglichen, wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson verwendet.

Die Überlebensanalyse erfolgte zunächst im univariaten Modell mit der Kaplan-Meier-Methode hinsichtlich des Gesamtüberlebens; die Gruppen wurden mit dem Log-rank-Test verglichen. Zur Beurteilung des von anderen Größen unabhängigen Einflusses erfolgte die multivariate Analyse mit der schrittweisen Cox-Regressionsanalyse (*stepwise-forward*).

Alle Irrtumswahrscheinlichkeiten (*p*) wurden 2-seitig ermittelt und Wahrscheinlichkeiten $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Methodischer Teil

5.1.1 Optimierung, Vergleich und Entwicklung von Markierungsmethoden

Im folgenden Abschnitt werden die Hybridisierungsergebnisse der verschiedenen Methoden (siehe 4.3 und 4.4) aufgeführt, die zur Markierung und Amplifizierung von DNA getestet und weiterentwickelt wurden, um sie für die Interphase-FISH- bzw. die CGH-Technik einsetzen zu können. Als Bewertungsmaßstäbe galten die objektiv mit der Aufnahmesoftware bestimmbaren Fluoreszenzintensitätswerte (*RI*, *raw intensity* der 16-bit Daten einer Aufnahme) der FISH-Signale im Vergleich zur Intensität des Hintergrundes auf Kernen, Chromosomen und Objektträger, sowie die Qualität des Hintergrunds und die subjektive Bewertbarkeit der FISH-Hybridisierungen bzw. die Qualität der Auswertung mit der CGH-Software.

Nicktranslation

Einfluss der eingesetzten DNA-Menge: Es wurden jeweils 2000 ng, 1000 ng, 500 ng, 200 ng, 100 ng und 50 ng BAC-DNA mittels Nicktranslation markiert und hybridisiert. Die Signalintensitäten bei Einsatz von 200 ng bis 2000 ng BAC-DNA waren identisch, erst ab dem Einsatz von nur 100 ng DNA verringerte sich auch die Signalintensität. Bei allen weiteren Experimenten wurden jeweils 1000 ng BAC-DNA eingesetzt, um den Einfluss der DNA-Menge auszuschließen.

Einfluss der DNA-Fragmentlänge: Die aus der Nicktranslation resultierenden DNA-Längen wurden durch Veränderung der in die Nicktranslation eingesetzten DNase-Menge variiert. Dabei lagen die erreichten Längen zwischen 100 bis 300 bp und 1000 bis 2000 bp. Eine Länge um 600 bp (400 bis 800 bp) stellte sich als optimal heraus; das Verhältnis von Intensität des FISH-Signals zur Intensität des Hintergrunds war hier am günstigsten. Bei kürzeren DNA-Fragmenten war die Intensität des Hintergrunds geringer, die Signalintensität jedoch zu schwach. DNA-Fragmente mit einer Länge größer 1000 bp steigerten zwar die Signalintensität, verursachten jedoch einen granulierten Hintergrund auf Chromosomen und Kernen, der eine eindeutige Identifizierung der Signale

Tab. 5.1: Einfluss der DNA-Fragmentlänge auf Signal und Hintergrund

DNA-Fragmentlänge in der Gelelektrophorese in bp	Belichtungszeit msec	in <i>RI</i> FISH-Signal	<i>RI</i> Hintergrund
100-400	2500	1000-1500	160-200
~ 600 (400-800)	2500	2000-3600	220-300
~ 1000 (700-2000)	2500	2000-4000	~ 220 + granuliert

Abkürzung: *RI* = *raw intensity*.

Tab. 5.2: Einfluss der Verwendung eines Pools von BAC-Klonen auf die Signalintensität

Anzahl der BAC-Klone pro Pool	Belichtungszeit msec	in <i>RI</i> FISH-Signal	<i>RI</i> Hintergrund
1 BAC-Klon	7000	600-900	~ 150
Pool aus 2 BAC-Klonen	7000	2400-2900	~ 150
Pool aus 3 BAC-Klonen	7000	3100-3800	~ 150
Pool aus 4 BAC-Klonen	7000	2000-3000	~ 150

Abkürzung: *RI* = *raw intensity*.

verhinderte (Tab. 5.1).

Benutzung eines Pools aus BAC-Klonen: Es wurden vier BAC-Klone in der Chromosomenregion 10q23.3 ausgewählt, die laut UCSC Genome Browser (<http://www.genome.ucsc.edu>) nebeneinander bzw. teilweise überlappend kartieren (siehe 4.2). Für die Hybridisierung wurden dann Pools aus zwei, drei bzw. vier Klonen eingesetzt. Die Verwendung von zwei und drei Klonen führte jeweils zu einer deutlichen Steigerung der Signalintensität, ohne dass sich die Intensität des Hintergrunds veränderte. Der Einsatz von vier Klonen brachte keine weitere Steigerung der Signalintensität, welche sich im Gegenteil leicht verringerte (Tab. 5.2).

Direkte und indirekte Markierung mit verschiedenen Fluorochromen: Für die einzelnen Spektralbereiche (grün, rot, nahe Infrarot) wurden jeweils die direkte und die indirekte Markierung verglichen, verschiedene Fluorochrome getestet und die jeweils beste Variante für die Interphase-FISH-Untersuchungen ermittelt (siehe Tab. 5.3).

Im grünen Spektralbereich waren die Signalintensitäten aller direkt markierten BAC-Klone schwach, wobei die Intensität in der Reihenfolge Rhodamin 110 > FITC > Alexa 488 abnahm. Die indirekte Markierung mit Biotin-dUTP und die Darstellung des Signals über die kovalente Bindung mit einem FITC-gekoppelten Avidin (Avidin-FITC) ergab das beste Ergebnis mit einer guten Signalintensität und einem geringen Hintergrund. Wurde ein weiterer Detektionsschritt mit der Bindung eines biotinylierten anti-Avidins und der erneuten Bindung von Avidin-FITC verwendet, konnte zwar die Signalintensität

deutlich erhöht werden, jedoch verhinderte die starke Granulierung des Hintergrunds die eindeutige Identifizierung der Signale im Kern.

Im roten Spektralbereich brachten die direkte Markierung mit Tamra-dUTP sowie die indirekte Markierung mit Digoxigenin-dUTP, welches mit an Antikörper gebundenes *TexasRed* dargestellt wurde, gleich starke Signalintensitäten; der Hintergrund war bei der indirekten Markierung geringfügig höher. Wurde das indirekt markierte Signal mit der Bindung weiterer Antikörper amplifiziert, hatte dieses ebenfalls die Erhöhung der Signalintensität verbunden mit einem unakzeptabel hohen und granulierten Hintergrund zur Folge. Die Signalintensitäten der mit *TexasRed*-dUTP und *SpectrumOrange*-dUTP direktmarkierten BAC-Klone waren schwach.

Im Spektralbereich nahe Infrarot wurde der Farbstoff Cy5 verwendet. Die Direktmarkierung mit Cy5-dUTP ergab sehr schwache Signalintensitäten, so dass die Signale nicht zuverlässig identifiziert werden konnten. Die indirekte Markierung mit Digoxigenin-dUTP und Darstellung des Signals mit an Antikörper gekoppeltem Cy5 führte zu einer Verstärkung der Signalintensität. Diese lag zwar deutlich unter den im grünen und roten Spektralbereich erreichten Werten, ermöglichte jedoch trotzdem eine eindeutige Identifizierung der Signale im Interphase-Kern, da es nahezu keinen Hintergrund gab.

Optimierung des Hybridisierungsprotokolls zur Verminderung des Hintergrunds: Weder durch eine zusätzliche Ethanol-Fällung der DNA zur weiteren Aufreinigung, noch durch Verminderung der Formaldehydkonzentration bei der Objektträgerfixierung um 80 %, Verwendung von Gelatine zur Blockierung des Hintergrundes oder Verwendung von Streptavidin-FITC statt Avidin-FITC zur spezifischen Darstellung von mit Biotin-dUTP markierten Sonden konnte eine Verminderung des Hintergrundes erreicht werden.

PCR (*polymerase chain reaction*)

In einem ersten Schritt sollte untersucht werden, ob eine Amplifizierung der BAC-DNA mittels PCR möglich ist; es wurden die DOP-PCR (degenerierte Oligonucleotidprimer-PCR) und die LIG-PCR (ligationsbasierte-PCR) verglichen. Im zweiten Schritt wurde die gleichzeitige Amplifizierung und Markierung von DNA mittels PCR durch Zugabe von markierten Nukleotiden in eine PCR-Reaktion getestet.

Amplifizierung (Primäre PCR): Sowohl die DOP- als auch die LIG-PCR konnten zur Amplifizierung von BAC-DNA erfolgreich verwendet werden. Bei Einsatz von 5 μ l PCR-Produkt in eine Nicktranslation resultierten Signal- und Hintergrundintensitäten

Tab. 5.3: Signalintensitäten und Hintergrund bei Markierung mit verschiedenen Fluorochromen

Markierung	Belichtungs- zeit in msec	<i>RI</i> FISH- Signal	Hintergrund*	subjektive Bewertbar- keit
Grüne Fluoreszenz				
<i>Direkte Markierung:</i>				
FITC-dUTP	2.500	~ 500	niedrig	nicht auswertbar auf
A488-dUTP	2.500	~ 250	niedrig	Grund zu schwacher
R110-dUTP	2.500	~ 650	niedrig	SI
<i>Indirekte Markierung mit FITC:</i>				
Einschichtige Detektion	2.500	1000-4000	niedrig	eindeutig
Dreischichtige Detektion	1.000	>4000	hoch, granuliert	nicht auswertbar auf Grund HG
Rote Fluoreszenz				
<i>Direkte Markierung:</i>				
Tamra-dUTP	2.500	1000-2500	niedrig	eindeutig
TR-dUTP	2.500	~ 300	niedrig, granuliert	nicht auswertbar auf
SO-dUTP	2.500	~ 350	niedrig	Grund zu schwacher SI
<i>Indirekte Markierung mit TR:</i>				
Zweischichtige Detektion	2.500	600-1200	niedrig	eindeutig
Dreischichtige Detektion	2.500	1600-3200	stark granuliert	nicht auswertbar auf Grund HG
Cy5 (Fluoreszenz nahe Infrarot)				
Direkte Markierung	10.000	~ 200	sehr niedrig	SI zu schwach
Indirekte Markierung	5.000	~ 400	sehr niedrig	eindeutig

Fettgedruckt: für den jeweiligen Spektralbereich beste Markierung. **RI*-Werte Hintergrund: niedrig = 100-300, sehr niedrig = <100, hoch = »300. Bei granuliertem Hintergrund lagen die *RI*-Werte dieser „Granulationen“ im Intensitätsbereich der FISH-Signale oder sogar darüber. Abkürzungen: A488 = Alexa488, Cy5 = Indodicarbocyanin, FITC = Fluorescein-isothiocyanat, HG = Hintergrund, R110 = Rhodamin110, *RI* = *raw intensity*, SI = Signalintensität, SO = *SpectrumOrange*, TR = *TexasRed*.

entsprechend einer Nicktranslation mit nichtamplifizierter BAC-DNA.

Markierung mittels PCR: Die PCR-Produkte aus einer primären DOP-PCR wurden in eine weitere PCR-Reaktion eingesetzt, entsprechend dem Protokoll einer primären PCR, der jedoch markierte Nucleotide zugegeben wurden. Nach Hybridisierung von 5 μ l PCR-Produkt war es allerdings nicht möglich, ein Signal zu identifizieren, da sich eine Vielzahl leuchtender *Spots* auf Kernen und Chromosomen abzeichnete. Das PCR-Produkt zeigte in der Gelelektrophorese eine Bande im Längenbereich der Primer unter 100 bp. Das Protokoll wurde daraufhin in folgenden Parametern geändert: die Annealingtemperatur wurde von 40°C auf 56°C erhöht und die Primerkonzentration von 3 μ M auf 2 μ M gesenkt (siehe 4.3.3). Dadurch war eine simultane Amplifizierung und Markierung der DNA möglich. Die Hybridisierungsergebnisse von 5 μ l Markierungs-DOP-PCR-Produkt erreichten Qualität und Signalintensität entsprechend der Hybridisierung eines 100 μ l Nicktranslationsansatzes mit 1000 ng DNA.

Gleichermaßen wurde die LIG-PCR variiert. Die Hybridisierung von mittels LIG-PCR markierter BAC-DNA resultierte in geringeren Signalintensitäten als sie mit der DOP-PCR erreicht wurden, war aber immer noch gut auswertbar.

Random Priming

Die Markierung von BAC-DNA mittels des *HexaLabel Plus DNA Labelling Kit* (Fermantas) führte zu Signalintensitäten, welche denjenigen der Nicktranslation entsprachen. Jedoch war der Hintergrund auf Kernen und Chromosomen granuliert und verhinderte die eindeutige Identifizierung von Signalen im Interphase-Kern. Da das Reaktionsprodukt mit 400 bis 4000 bp Fragment-Länge nach eigener Erfahrung aus der Nicktranslation (siehe 5.1.1) zu lang war, wurde ein DNase-Verdau angeschlossen. Dadurch wurde der granuliert Hintergrund beseitigt; allerdings wurde die Signalintensität halbiert.

Um ein kürzeres Reaktionsprodukt zu erhalten und somit den DNase-Verdau zu umgehen, wurde das Protokoll abgewandelt (siehe 4.3.5). Die Konzentration an Primern wurde erhöht. Mehrere Zyklen aus Denaturierung und Reaktion wurden durchgeführt. Ein Protokoll mit erhöhter Primer- und Enzymmenge wurde ebenfalls verwendet, um eine Limitierung der Reaktion durch das Enzym auszuschließen. Die Veränderungen führten zu einer Verkürzung der DNA-Fragmentlängen und einer Erhöhung der Menge an resultierendem Reaktionsprodukt (Tab. 5.4). Trotz maximaler Erhöhung der Primerkonzentration konnte die notwendige Fragmentlänge nicht erreicht werden um einen granulierten Hintergrund zu verhindern, was einen Verdau der Reaktionsprodukte wei-

Tab. 5.4: Beeinflussung von Fragmentlänge und Produktmenge beim *Random Priming*

Protokoll	Produkt-Länge in bp	Produkt-Menge*
<i>HexaLabel Plus DNA Labelling Kit</i>	400-4000	
3 Zyklen	400-2000	etwa verdoppelt
1,5 und 2fache Primerkonzentration	400-4000	keine Veränderung
4fache Primerkonzentration	400-4000	etwa verdoppelt
erhöhte Primer- und Enzymkonz.	400-3000	stark amplifiziert

*Menge an Reaktionsprodukt in der Gelelektrophorese im Vergleich zum *HexaLabel Plus DNA Labelling Kit*. Abkürzung: bp = Basenpaare.

terhin notwendig machte.

Der Einsatz bereits verdauter DNA in die Reaktion war erfolgreich, führte allerdings zu einem sehr schwachen Signal und einem hohen und granulierten Hintergrund.

TdT-mediated dUTP-X nick end labeling (TUNEL)

Mit dem *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche)* konnte bis auf eine Ausnahme kein Signal nachgewiesen werden. Das in diesem *Kit* verwendete Fluorochrom Fluorescein ergibt nach meinem Vergleich (siehe 5.1.1) nur eine schwache Signalintensität. Daher wurde aus Einzelkomponenten ein Protokoll nach Angaben der Firma *Fermentas* erstellt, um mit Biotin-dUTP markieren zu können (siehe 4.3.6). Der vorherige Verdau mit Mse I stellte sich dabei als die verlässlichste Methode heraus, die immer zu einem Signal führte, während die Markierung nach DNase-Verdau oft erfolglos blieb. Nach Markierung von mit Mse I verdauter DNA mit Biotin-dUTP nach eigenem Protokoll (siehe 4.3.6) wurde eine Signalintensität entsprechend einer Nicktranslation erreicht. Ein anfänglich granulierter Hintergrund auf Chromosomen und Kernen konnte durch Verkürzung der Reaktionszeit von sechs auf drei Stunden beseitigt werden. Bei einer Reaktionszeit von 30 min kam es zu einer niedrigeren Signalintensität. Ein unspezifischer, teilweise granulierter Hintergrund auf dem Objektträger war jedoch immer vorhanden. Verschiedene Verhältnisse von markierten dUTPs zu dNTPs oder dTTPs ergaben keine Veränderung der Signalintensität oder des Hintergrundes. Jedoch war im Gel umso mehr Produkt, je mehr dNTP im Verhältnis zu Biotin-dUTP eingesetzt wurde. Wurden ausschließlich Biotin-dUTPs in die Reaktion eingesetzt, hatte dieses ein schwaches Signal und einen sehr starken granulierten Hintergrund zu Folge.

Ich versuchte, den für die TUNEL-Reaktion notwendigen DNA-Verdau gleichzeitig mit der TUNEL-Reaktion durchzuführen, indem MseI in die Reaktion mit eingesetzt wurde. Dies führte zu einem nur schwachen Signal mit einem sehr hohen Hintergrund.

Chemische Markierung

Bei beiden von mir getesteten, im Handel erhältlichen Methoden zur chemischen Markierung von DNA (*ARES DNA labeling Kit* und *ULYSIS Nucleic Acid Labeling Kit; Molecular Probes*) war der größte Teil der Hybridisierungen ohne Erfolg.

In den erfolgreichen Hybridisierungen mit dem *ARES DNA labeling Kit* konnte zwar eine Signalintensität entsprechend einer Nicktranslation erreicht werden, allerdings ergab sich ein sehr starker Hintergrund auf den Objektträgern, der für eine Interphase-FISH-Analyse unakzeptabel war. Zusätzliche Reinigungsschritte der DNA vor und nach der Reaktion brachten keine Verbesserung.

In den wenigen Fällen, bei denen mit dem *ULYSIS Nucleic Acid Labeling Kit* ein Signal erreicht wurde, war dieses so schwach, dass keine Aufnahme möglich war, da während der erforderlichen Belichtungszeit soviel Signalintensität durch Ausbleichen verloren ging, dass kein Unterschied zum Hintergrund mehr vorhanden war.

Da mit den bisher erhältlichen chemischen Markierungskits kein verlässliches Ergebnis erzielt werden konnte, wurde die Firma *Kreatech* mit der Markierung der BAC-Sonden beauftragt.

Der durch die Firma *Kreatech* durchgeführte Versuch einer Markierung von BAC-DNA, welche von mir präpariert wurde, blieb ebenfalls erfolglos. Die Firma *Kreatech* musste die DNA nach eigenem Protokoll isolieren, um sie danach mit *dGreen* (grüne Fluoreszenz) und Rhodamin (rote Fluoreszenz) markieren zu können. Nach Angaben der Firma *Kreatech* sollten 10 ng DNA in eine Hybridisierung eingesetzt werden. Der Einsatz von 10 ng mit Rhodamin markierter DNA ergab ein Hybridisierungsergebnis entsprechend einer mittels Nicktranslation mit Tamra-dUTP markierten Probe. Von der mit *dGreen* markierten Probe mussten jedoch 500 ng eingesetzt werden, um Signalintensitäten entsprechend einer Nicktranslation mit Biotin-dUTP zu erreichen, wobei der Hintergrund höher als mit herkömmlicher Nicktranslation war.

Rolling Circle Amplification

Die Amplifizierung von 100 pg bzw. 10 ng BAC-DNA mittels *Rolling Circle Amplification* mit dem *TempliPhi DNA Sequencing Template Amplification Kit* (*Amersham Biosciences*) ergab genügend DNA, die anschließend mittels Nicktranslation markiert und erfolgreich hybridisiert werden konnte.

Die Zugabe von Bio-dUTP in diesen Reaktionsansatz führte zu einer gleichzeitigen Amplifizierung und Markierung von BAC-DNA, allerdings war das Signal sehr schwach.

Durch Verwendung eines eigenen Protokolls (siehe 4.3.8) konnte die simultane Markierung und Amplifizierung mittels *Rolling Circle Amplification* erreicht werden mit Signalintensitäten entsprechend einer Nicktranslation. Der Hintergrund war teilweise granuliert.

Sowohl die Nicktranslation, als auch die DOP-PCR waren gut für die Markierung von Sonden für die Interphase-FISH-Analyse geeignet. *Random Priming* und chemische Markierung sind auf Grund in der Methode begründeter Probleme nicht geeignet, andere Methoden bedürfen der weiteren Etablierung.

5.1.2 Interphase-FISH-Untersuchung an Paraffinmaterial

Auf Grund der Ergebnisse in 5.1.1 wurden für die Interphase-FISH-Untersuchung DNA-Pools aus zwei bis drei Klonen pro Sonde mittels Nicktranslation mit den für die entsprechenden Spektralbereiche besten Fluorochromen (siehe 4.6 und Tab. 5.3) markiert; die Länge der DNA im Gel wurde zwischen 400 und 800 bp eingestellt.

Der reine Pepsin-Verdau stellte sich als beste Möglichkeit zum Verdau des Gewebes heraus und wurde für alle Glioblastome verwendet. Der Verdau mit Proteinase K griff sehr frühzeitig die Kerne an, ohne das umliegende Gewebe zufriedenstellend zu entfernen; Erythrozyten wurden überhaupt nicht verdaut. In Oligodendrogliomen fanden sich durch Pepsin oder Proteinase K unverdaubare Proteingerüste, welche jedoch durch einen zusätzlichen Verdau mit Kollagenase entfernt werden konnten.

Die größtmögliche Schnittdicke, bei der ein akzeptables Hybridisierungsergebnis erzielt wurde, betrug $10\ \mu\text{m}$. Je dicker die Schnitte, desto schwächer waren die Signalintensitäten, desto höher war der Hintergrund bedingt durch unverdautes Gewebe und desto mehr Kerne überlappten miteinander; es waren jedoch weniger Kerne angeschnitten. Durch Auszählung der Signale einer unveränderten Kontrollsonde in jeweils 200 Kernen eines Oligodendroglioms (ID 24) wurde der Anteil der angeschnittenen Kerne ermittelt. Bei einer Schnittdicke von $6\ \mu\text{m}$ lagen die Mittelwerte der Signale pro Kern zwischen 1,34 und 1,56, was einem Anteil an angeschnittenen Kernen von 44 bis 66 % entspricht. Bei $10\ \mu\text{m}$ dicken Schnitten wurden durchschnittlich 1,8 bis 1,95 Signale pro Kern gezählt, das bedeutet 5 bis 20 % der Kerne waren angeschnitten. Da Kerne, die kein Signal aufwiesen, nicht gewertet wurden, lag die tatsächliche Zahl angeschnittener Kerne sogar noch höher. Jedoch konnten diese Kerne von vornherein erkannt und ausgeschlossen werden und beeinflussten dadurch das Ergebnis nicht.

Für die Untersuchung der Gliome wurden darum $10\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte verwendet und

ein Verlust dann angenommen, wenn dieser in mehr als 20 % der Kerne nachweisbar war. Das Protokoll nach meine Modifizierungen brachte sehr gute Hybridisierungsergebnisse; alle Hybridisierungen waren eindeutig auswertbar (vgl. Abb. 5.1).

5.1.3 Amplifizierung und Markierung genomischer DNA mittels PCR für die CGH-Analyse

Es wurden die *LIG-PCR* und die *DOP-PCR* zur Amplifizierung genomischer DNA für die CGH-Analyse getestet. Außerdem wurde zur Markierung der DNA die Nicktranslation mit der *PCR* verglichen.

Zunächst wurde normale DNA (aus Lymphozyten von gesunden Probanden) mittels *PCR* amplifiziert und gegen nichtamplifizierte normale DNA hybridisiert. Zum Vergleich wurde jeweils normale, nichtamplifizierte DNA miteinander hybridisiert, was ein glattes Profil ohne Aberrationen, entsprechend einem normalen Karyotyp ergab. Die Markierung erfolgte jeweils mittels Nicktranslation. Bei mit *DOP-PCR* amplifizierter DNA zeigten sich starke Verluste der Telomere sowie der repetitiven Region unterhalb der Zentromere (insbesondere der Chromosomen 1, 9 und 16). Außerdem fanden sich falsch-positive Verluste von Chromosom 17 und 19. Dagegen zeigten nach *LIG-PCR* lediglich einzelne Telomere eine Tendenz hin zum Verlust und es fand sich ein Gewinn der repetitiven Region unterhalb des Zentromers von Chromosom 9. Wurden beide Normal-DNAs mit *DOP-* bzw. *LIG-PCR* amplifiziert, ergab sich jeweils ein glattes Profil und die falschen Aberrationen wurden ausgeglichen. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die DNAs mittels Nicktranslation oder in einer sekundären *Label-PCR* markiert wurden. Die CGH-Profile nach *LIG-PCR* waren insgesamt gleichmäßiger als nach *DOP-PCR*.

Um die *PCR*-Methoden an Tumor-DNA zu testen, wurde zunächst DNA aus Frischmaterial einer Zelllinie, SKBR3, verwendet, deren Aberrationen gut bekannt sind. Es wurden jeweils 200 ng DNA in eine *PCR* eingesetzt. Wurde nur die Tumor-DNA mittels *PCR* amplifiziert, erbrachte die *DOP-PCR* fehlerhafte Ergebnisse: Einige Aberrationen wurden nicht erkannt (+17p,+16p,+19q) und einige falsch-negative Verluste, insbesondere telomernaher Regionen, sowie von 19p kamen hinzu. Die CGH-Analyse nach *LIG-PCR* war akzeptabel, da bis auf den Verlust von 10p alle Aberrationen erkannt wurden und sich auch keine falsch positiven Aberrationen fanden, allerdings waren die Profile ungleichmäßig. Wurde auch die Kontroll-DNA mit der jeweiligen *PCR* amplifiziert und die DNA mittels Nicktranslation markiert, ergaben sowohl die *DOP-PCR* als auch die *LIG-PCR* ein Profil entsprechend einer CGH an nicht amplifizierter DNA und die Hy-

bridisierungsqualität war gleich gut. Wurde mittels *Label*-DOP markiert, waren einzelne Aberrationen schwächer ausgeprägt oder fehlten (+17q,+19q). Nach *LIG*-PCR kamen einige Aberrationen weniger deutlicher heraus als nach Nicktranslation, beide Markierungsmethoden ergaben jedoch richtige Ergebnisse. Auch wenn nur 1 ng Tumor-DNA in die primäre *LIG*-PCR eingesetzt wurde, waren alle Aberrationen nachweisbar.

Schließlich wendete ich die *PCRs* an DNA aus formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material eines Glioblastoms meiner Serie (ID 23) an. Hierbei wurden Tumor- und Kontroll-DNA auf Grund der eben genannten Ergebnisse immer gleich behandelt. Zunächst wurden 2 µg nichtamplifizierte Tumor-DNA mittels herkömmlicher CGH untersucht, um die Aberrationen des Tumors zu ermitteln (siehe Tab. 5.6). Jeweils 200 ng Tumor- bzw. Kontroll-DNA wurden in die DOP- bzw. *LIG*-PCR eingesetzt und die *PCR*-Produkte anschließend mit Nicktranslation sowie *Label*-PCR markiert. Nach Amplifizierung mittels DOP-PCR waren die Aberrationen entweder nicht mehr nachweisbar oder so abgeschwächt, dass sie unterhalb der Grenze für Gewinne bzw. Verluste lagen. Wurde mittels *Label*-DOP markiert, kamen die Veränderungen etwas deutlicher heraus als nach Markierung mittels Nicktranslation. Dagegen wurden nach *LIG*-PCR alle Aberrationen im Tumor eindeutig nachgewiesen. Die Markierung mittels *Label*-*LIG* stellte sich hier als eindeutig besser heraus. Die Aberrationen kamen insgesamt deutlicher heraus und das Profil war gleichmäßiger. Außerdem waren einige Aberrationen nach Markierung mit Nicktranslation abgeschwächt (-10q) oder nicht nachweisbar (-9p,-18,+17). Bei Einsatz von nur 1 ng Tumor-DNA in die primäre *LIG*-PCR wurden bis auf den Verlust von Chromosom 18 alle Aberrationen nachgewiesen. Auch hier war die Markierung mittels *Label*-*LIG* besser als mittels Nicktranslation, da die Aberrationen stärker ausgeprägt waren. Insgesamt waren die Profile auf Grund einer schlechteren Hybridisierungsqualität jedoch ungleichmäßiger als bei den anderen Hybridisierungen.

Auf Grund der eben aufgeführten Ergebnisse verwendete ich für die CGH-Untersuchung an mikrodisseziertem, formalinfixiertem und paraffineingebetteten Material der zwei unterschiedlichen histologischen Anteile von 13 Glioblastomen mit einer oligodendroglialen Komponente (GBMO) die *LIG*-PCR zur Amplifizierung und Markierung der DNA (vgl. Abb. 5.1). Von 10 GBMO waren beide Anteile auf dem Paraffinblock vorhanden, von 3 GBMO nur noch ein Anteil. Von somit 23 CGH-Experimenten waren 22 erfolgreich. Lediglich bei einem Tumor (ID 13), von dem auch nur ein Anteil zur Verfügung stand, war die Hybridisierung auf Grund eines zu hohen Hintergrundes und zu niedriger Signalintensität nicht auswertbar.

5.1.4 Vergleich der CGH- und Interphase-FISH-Analysen

Die Ergebnisse der CGH- und Interphase-FISH-Analysen stimmten bis auf wenige Ausnahmen gut überein (siehe Tab. 5.6). Einzelne Aberrationen fanden sich jedoch in einigen Tumoren nur in der Interphase-FISH-Untersuchung (ID 2: +21q11.2; ID 3: +1,+10,-17p; ID 5: +19,-17p; ID 8: +19q; ID 9: -10,-21; ID 10: +17p; ID 11: +1,-17,+18,+21), andere wiederum nur in der CGH-Analyse (ID 10: +1; ID 12 und ID 1: -19). Abb. 5.1 zeigt beispielhaft CGH- und Interphase-FISH-Ergebnis für ein GBMO (ID 12).

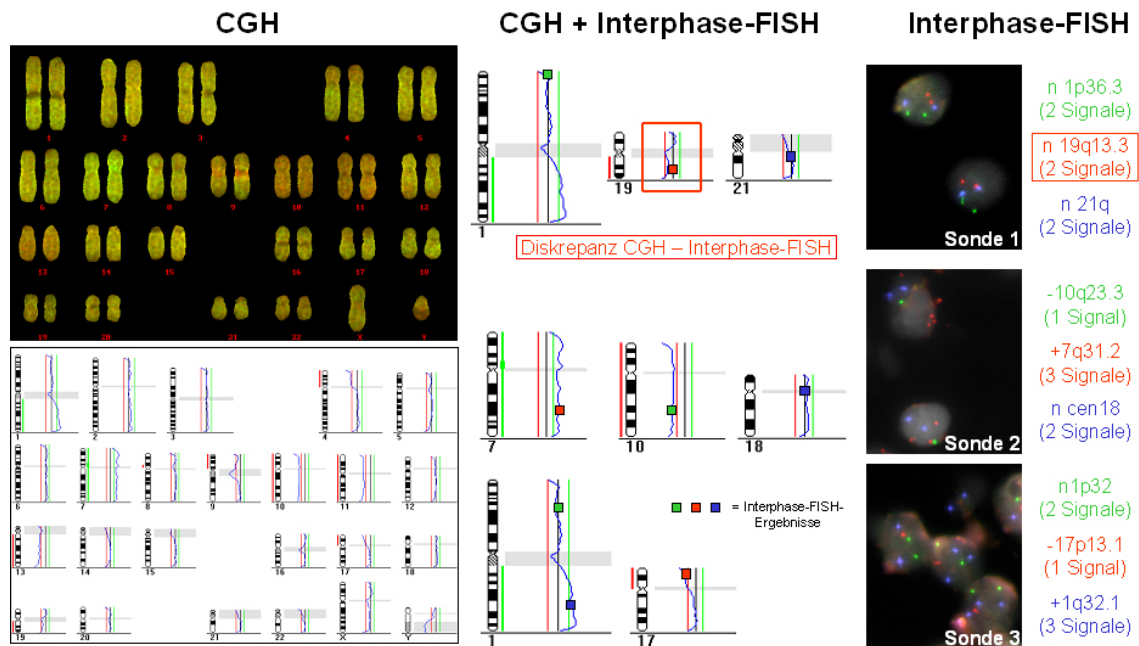


Abb. 5.1: CGH- und Interphase-FISH-Ergebnis am Beispiel des oligodendroglialen Anteils von Fall ID 12. Links die CGH-Ergebnisse (oben ein Karyogramm, darunter das ermittelte CGH-Profil). In der Mitte die CGH-Profile der Chromosomen, welche auch mit Interphase-FISH analysiert wurden. Die Lokalisation der DNA-Sonden wurde mit einer Box markiert. Rechts die Interphase-FISH-Ergebnisse für die einzelnen drei Sonden. Der mittels CGH-Analyse festgestellte Gewinn auf Chromosom 7 und 1q korrespondierte zu 3 Signalen mittels Interphase-FISH, ebenso wie der Verlust von Chromosom 10 und 17p mit 1 Signal. Keine Übereinstimmung fand sich für Chromosom 19, dass für die Auswertung von CGH-Ergebnissen generell problematisch ist. Abkürzungen: CGH = Vergleichende genomische Hybridisierung, FISH = Fluoreszenz in situ Hybridisierung, n = normal.

5.2 Interphase-FISH- und CGH-Untersuchung an Gliomen

Mittels Interphase-FISH- und CGH-Untersuchung wurden 13 Glioblastome mit oligodendroglialer Komponente (GBMO) (zur Definition vgl. 2.2) auf die genetischen Aberrationen ihrer astrozytären und oligodendroglialen Anteile untersucht. Auf Grund des histologischen Erscheinungsbildes des oligodendroglialen, GFAP-negativen Anteils, wur-

den diese besonderen Glioblastome unterteilt in Glioblastome mit typischer Honigwabenstruktur (GBMO-H, $n = 8$) und Glioblastome ohne Honigwabenstruktur mit runden oligodendrozyten-ähnlichen Zellen (GBMO-R, $n = 5$) (siehe 4.1.2). Als Kontrollgruppen wurden 10 klassische Glioblastome (GBM) und drei Oligodendrogliome (O) mittels Interphase-FISH-Technik, sowie ein Glioblastom und zwei Oligodendrogliome mit der CGH-Analyse untersucht. Um eine möglichst hohe Reinheit der einzelnen Tumoranteile zu erreichen, wurden alle GBMO für die CGH-Analyse (welche getrennt nach Tumoranteilen durchgeführt wurde) unter lichtmikroskopischer Kontrolle mikrodissiziert und sich dabei an den HE-Schnitten orientiert.

5.2.1 Klinische Charakteristik der Glioblastompatienten

Die Gruppe der 23 untersuchten Patienten mit einem Glioblastom (13 GBMO und 10 klassische GBM) bestand aus 11 männlichen und 12 weiblichen Patienten mit einem medianen Alter von 59 Jahren (42-75 Jahre). 19 Patienten (83 %) erhielten eine postoperative Bestrahlung und 9 (39 %) eine zusätzliche Chemotherapie. Die mittlere Überlebenszeit betrug 355 Tage (272-438 Tage). Einen Überblick der klinischen Daten getrennt für die histologischen Gruppen gibt Tab. 5.5. Hinsichtlich Alter ($p = 0,072$), Geschlecht ($p = 0,4$), Durchführung von Chemotherapie ($p = 0,67$) oder Bestrahlung ($p = 0,6$) unterschieden sich die GBMO und die GBM nicht.

5.2.2 Genetische Veränderungen in den untersuchten Tumoren

Für die Interphase-FISH-Analyse kamen zwei verschiedene Kombinationen genetischer Marker zum Einsatz, die einerseits oligodendrogliale Tumorzellen (lokalisiert auf 1p36.3 und 19q13.3, Verlust) und andererseits astrozytäre Tumoranteile (lokalisiert auf 7q31.2 [Gewinn] und 10q23.3 [Verlust]) charakterisierten (siehe 4.2). Zur Kontrolle der Hybridisierungseffizienz der DNA-Sonden und der Ploidie der Tumoren enthielt jedes Set eine dritte DNA-Sonde, die entweder auf Chromosom 21q11.2 oder auf Zentromer 18 lokalisiert war. Um auch eine Einschätzung der Kopienzahl des Tumorsuppressorgens *TP53* sowie einen direkten Vergleich der Kopienzahl des kurzen und langen Arms von Chromosom 1 zu erhalten, wurden drei DNA-Sonden dieser Regionen (17p13.1, 1p32 und 1q32.1) als drittes Set in der Interphase-FISH-Analyse eingesetzt.

Alle Tumoren zeigten sowohl in der Interphase-FISH- als auch in der CGH-Untersuchung chromosomale Aberrationen (Tab. 5.6). Der ANCA-Index (*average number*

Tab. 5.5: Vergleich der klinische Daten der Patienten mit GBMO und GBM

klinische Daten	GBMO (n=13)		GBM (n=10)		p
		GBMO-H (n=8)	GBMO-R (n=5)		
medianes Alter in J ¹	52 (42-72)	55 (42-72)	51 (46-70)	67,5 (46-75)	
mittleres Alter in J ¹	55,38 (49-61)	55,13 (47-63)	55,80 (42-70)	63,80 (56-72)	0,072
Geschlecht w (%)	8 (61,5 %)	6 (75 %)	2 (40 %)	4 (40 %)	0,4
Bestrahlung p.o. ja (%)	10 (76,9 %)	6 (75 %)	4 (80 %)	9 (90 %)	0,6
Chemotherapie ja (%)	6 (46,2 %)	4 (50 %)	2 (40 %)	3 (30 %)	0,67
mittlere Überlebenszeit in d ¹	404(284-524)	386 (206-566)	430 (327-533)	282 (196-368)	

¹Bei Mittelwerten ist in Klammern das 95-Prozent-Konfidenzintervalls, bei Medianwerten die Spannweite angegeben. Abkürzungen: GBMO = Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente, GBMO-H = Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente mit Honigwabenzellen, GBMO-R = Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente mit rundlichen Zellen, GBM = klassisches Glioblastom, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, n = Anzahl, J = Jahr, m = männlich, w = weiblich, p.o. = postoperativ, d = Tage

of chromosomal aberrations – durchschnittliche Anzahl chromosomaler Aberrationen) (Ried et al. 1999) für die GBMO betrug 13,25. Die Anzahl der Aberrationen des mittels CGH-Analyse untersuchten GBM (ID 23) betrug 9. Bei dem OII (ID 25) fanden sich 4 Aberrationen und bei dem OIII (ID 24) 11 Aberrationen. Die häufigste Veränderung in den Glioblastomen war der Gewinn des langen Arms von Chromosom 7 und der Verlust des langen Arms von Chromosom 10. Diese beiden Veränderungen fanden sich gemeinsam in allen klassischen GBM (10/10; ID 14-23), in allen GBMO-R (5/5; ID 5,8,9,10,12) und in vier von acht GBMO-H (ID 2,4,7,13). Alle O (ID 24-26) und ein GBMO-H (ID 6) zeigten einen kombinierten Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19.

Die Ergebnisse der Interphase-FISH-Untersuchungen wurden mit der histologischen Beurteilung der astrozytären und oligodendroglialen Tumorareale und der GFAP-Ergebnisse verglichen. Abbildung 5.2 zeigt beispielhaft diese Ergebnisse für ein GBMO-H (ID 11) und ein GBMO-R (ID 9). Beide Anteile des GBMO-H, sowohl der oligodendrogliale als auch der astrozytäre, hatten in der Interphase-FISH-Untersuchung einen Verlust des langen Arms von Chromosom 19 und des kurzen Arms von Chromosom 17 sowie einen Gewinn des langen Arms von Chromosom 1 und Gewinn von Chromosom 21. Zusätzlich wies der oligodendrogliale Anteil einen Gewinn der langen Arme der Chromo-

Tab. 5.6: Zusammenfassung der Ergebnisse der Interphase-FISH- und CGH-Untersuchungen an 13 GBMO, 10 GBM und 3 O

ID	Gruppe	Oligodendroglialer Anteil ¹					Astrozytärer Anteil ¹					Interphase-FISH: 1. Zeile / CGH: 2. Zeile					CGH					Verluste					Gewinne				
		1p36.3	1q32.1	10q23.3	17p13.1	21q11.2	1p36.3	1q32.1	10q23.3	17p13.1	21q11.2	1p36.3	1q32.1	10q23.3	17p13.1	21q11.2	1p36.3	1q32.1	10q23.3	17p13.1	21q11.2	1p36.3	1q32.1	10q23.3	17p13.1	21q11.2	1p36.3	1q32.1	10q23.3	17p13.1	21q11.2
1	GBMO-H	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	GBMO-H	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	GBMO-H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	GBMO-H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	GBMO-R	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	GBMO-H	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	GBMO-H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	GBMO-R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	GBMO-R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	GBMO-R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	GBMO-H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	GBMO-R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	GBMO-H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	GBM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	GBM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	GBM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	GBM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	GBM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	GBM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	GBM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	GBM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	GBM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	GBM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	OIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	OII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	OII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Grau unterlegt sind solche Anteile eines GBMO, die nicht mehr auf dem Paraffinblock vorhanden waren und deshalb für die Untersuchung nicht mehr zur Verfügung standen (ID 4,7,13). ¹Die Untersuchungsergebnisse der *klassischen* GBM sind unter Astrozytärer Anteil, die der O unter oligodendroglialer Anteil eingeordnet. Abkürzungen und Zeichen: ID = Identifikationsnummer, GBMO-H = Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente mit Honigwabensstruktur, GBMO-R = Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente mit runden Zellen, GBM = klassisches Glioblastom, O = Oligodendrogliom, + = Gewinn, - = Verlust, n. a. = nicht auswertbar, n. d. = nicht durchgeführt, () = Veränderung in weniger als 30 % der Zellen in der Interphase-FISH-Untersuchung, amp = Amplifikation.

somen 7 und 10 und des kurzen Arms von Chromosom 1 auf, während der astrozytäre Anteil zusätzlich einen Gewinn des Zentromers von Chromosom 18 zeigte. Der oligodendrogliale Anteil des GBMO-R bestand überwiegend aus triploiden Tumorzellen und zeigte einen Gewinn des gesamten Chromosoms 1, der langen Arme der Chromosomen 7 und 19 und des kurzen Arms von Chromosom 17, sowie einen Verlust des langen Arms von Chromosom 10. Der astrozytäre Anteil hatte in der Interphase-FISH-Untersuchung größtenteils diploide Tumorzellen und einen höheren Anteil an unveränderten Zellen. Er zeigte ebenfalls den Gewinn des Chromosoms 1, der langen Arme der Chromosomen 7 und 19 und des kurzen Arms von Chromosom 17. Zusätzlich fand sich der Gewinn des Zentromers von Chromosom 18. Der Verlust des langen Arms von Chromosom 10 fand sich nur in einem kleinen Anteil der Zellen, weshalb dieses Ergebnis nur in der Interphase-FISH- jedoch nicht mittels CGH-Analyse erkennbar war.

Genetische Klassifizierung der Glioblastome

Mit Hilfe meines SONDENSSETS erzielte ich die Einteilung der GBMO in vier genetische Gruppen, entsprechend Jeuken et al. (Jeuken et al. 2001) (Abb. 5.3):

1. eine „astrozytäre“ Gruppe gekennzeichnet durch die Kombination aus Gewinn von Chromosom 7 und Verlust von Chromosom 10,
2. eine „oligodendrogliale“ Gruppe, gekennzeichnet durch den kombinierten Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19,
3. eine „intermediäre“ Gruppe mit Verlust des telomerischen Anteils des kurzen Arms von Chromosom 1 und dem Gewinn von Chromosom 7 und eine
4. Gruppe von Tumoren („andere“), die keine der genannten Veränderungen aufwiesen.

Alle drei O (ID 24-26) entsprachen genetisch der „oligodendroglialen“ Gruppe und alle klassischen GBM (ID 14-23) ließen sich der „astrozytären“ Gruppe zuordnen. Dagegen fand ich bei den GBMO alle vier genetischen Gruppen. Der größte Teil der GBMO (9 von 13 Tumoren, 69 %) hatte die typisch „astrozytären“ Veränderungen, wobei alle fünf GBMO-R (ID 5,8,9,10,12) und vier der acht GBMO-H (ID 2,4,7,13) der „astrozytären“ Gruppe entsprachen. Ein GBMO-H (ID 6) wies den „oligodendroglialen“ Genotyp auf, ein GBMO-H (ID 1) wurde in die „intermediäre“ Gruppe und 2 GBMO-H (ID 3 und 11) in die Gruppe „andere“ eingeordnet. Letztere zeigten in der Interphase-FISH-Untersuchung

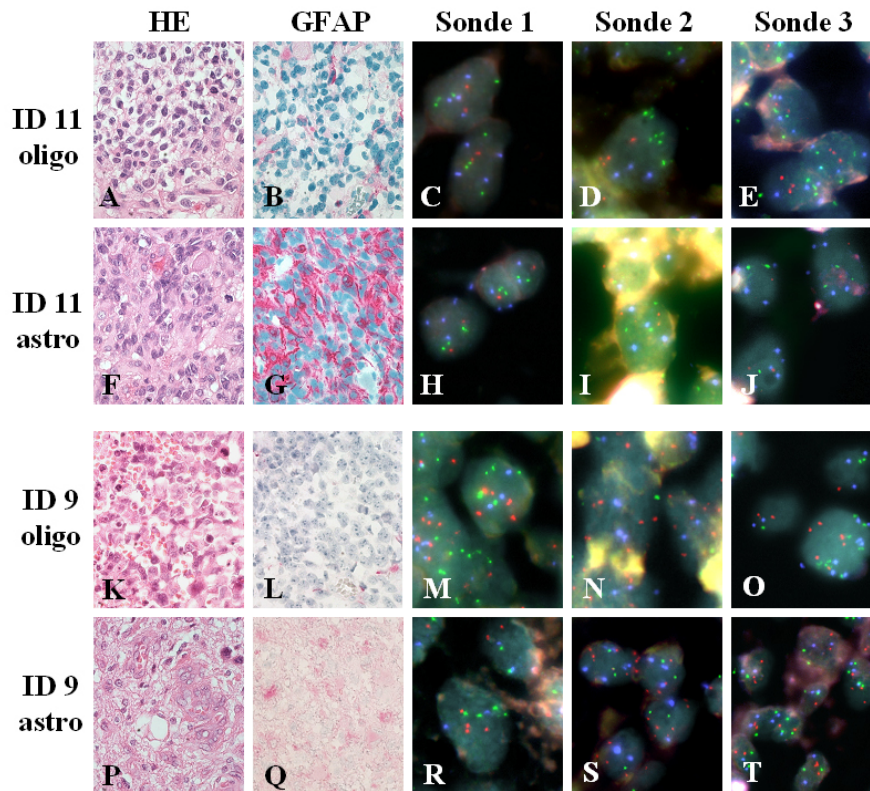


Abb. 5.2: HE-, GFAP-Färbung (x350) und Interphase-FISH-Bilder (x400) der oligodendroglialen und astrozytären Anteile eines GBMO-H (ID 11) und eines GBMO-R (ID 9). Sonde 1 (C,H,M,R): grün (g) = 1p36.3, rot (r) = 19q13.3, blau (b) = 21q11.2. Sonde 2 (D,I,N,S): g = 10q23.3, r = 7q31.2, b = cen18. Sonde 3 (E,J,O,T): g = 1p32, r = 17p13.1, b = 1q32.1. **ID 11:** Oligodendroglialer Anteil (Reihe 1) mit Honigwabenzellen in der HE-Färbung (A), GFAP-negativ (B). Triploide Tumorzellen: +1p/-19q/+21 (C: 4xg, 2xr, 4xb), +7/+10/normales cen18 (D: 4xr, 5xg, 3xb), +1p/+1q/-17p (E: 4xg, 4xb, 2xr). Astrozytärer Anteil (Reihe 2) mit länglichen Zellen (F) und GFAP-Positivität (G). normales 1p/-19q/+21 (H: 3xg, 1xr, 4xb), +cen18 (I: 4xb Signale), normales 1p/+1q/-17p (J: 3xg, 4xb, 2xr). **ID 9:** Oligodendroglialer Anteil (3. Reihe) mit auffällig rundlichen Zellen (K), GFAP-Negativität (L). Überwiegend triploide Tumorzellen: +1p/+19q/normales 21q (M: 5xg, 5xr, 3xb), +7/-10/normales cen18 (N: 5xr, 2xg, 3xb), +1p/+1q/+17q (O: 5xg, 5xb, 5xr). 4. Reihe: astrozytärer (P), GFAP-positiver (Q) Anteil. Diploide Tumorzellen: +1p/+19q/normales 21q (R: 3xg, 3xr, 2xg), +7q/-10/+cen18 (S: 3xr, 1xg, 2xb) +1p/+1q/+17p (T: 3xg, 3xr, 3xb). Außerdem normale Zellen (R,T: 2xg, 2xr, 2xb).

einen Gewinn auf dem langen Arm von Chromosom 10 und 7 im oligodendroglialen Anteil. Mittels CGH-Analyse wurden in Tumor 11 der Verlust des kurzen und Gewinn des langen Arms von Chromosom 3 detektiert, eine Veränderung, die für Plattenepithelkarzinome typisch ist und in Tumor 3 ebenfalls ein Gewinn auf dem langen Arm von Chromosom 3. Beide zeigten außerdem einen Verlust des *TP53*-Gens und im astrozytären Anteil einen Verlust auf dem kurzen Arm von Chromosom 16. Ein Gewinn auf dem langen Arm von Chromosom 10 und ein Verlust auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 wurde exklusiv nur in diesen beiden Tumoren gesehen. Evtl. sind diese Veränderungen mit für einen vierten genetischen Entstehungsweg verantwortlich.

Durch Analyse der Literatur fand ich, dass diese vier genetischen Gruppen bisher in fast allen histologischen Gruppen von Gliomen (A, O, OA, GBM) auftraten (Bigner et al.

1999, Huhn et al. 1999, Jeuken et al. 1999, Kros et al. 1999, Nakamura et al. 2000, He et al. 2001, Jeuken et al. 2001, Kraus et al. 2001a, Burton et al. 2002a, Dong et al. 2002, Mueller et al. 2002, Watanabe et al. 2002, Walker et al. 2003), wenn auch unterschiedlich häufig. Die von mir untersuchten Gliome, sowie die bisher in der Literatur untersuchten histologischen Gruppen von Gliomen, wurden in Abbildung 5.3 den vier genetischen Gruppen und den aus der Literatur bekannten sowie von mir vermuteten genetischen Entstehungswegen der Gliome zugeordnet. Ich nehme an dieser Stelle die Diskussion vorweg, da es für das Verständnis der weiteren Abschnitte des Ergebnisteils notwendig ist.

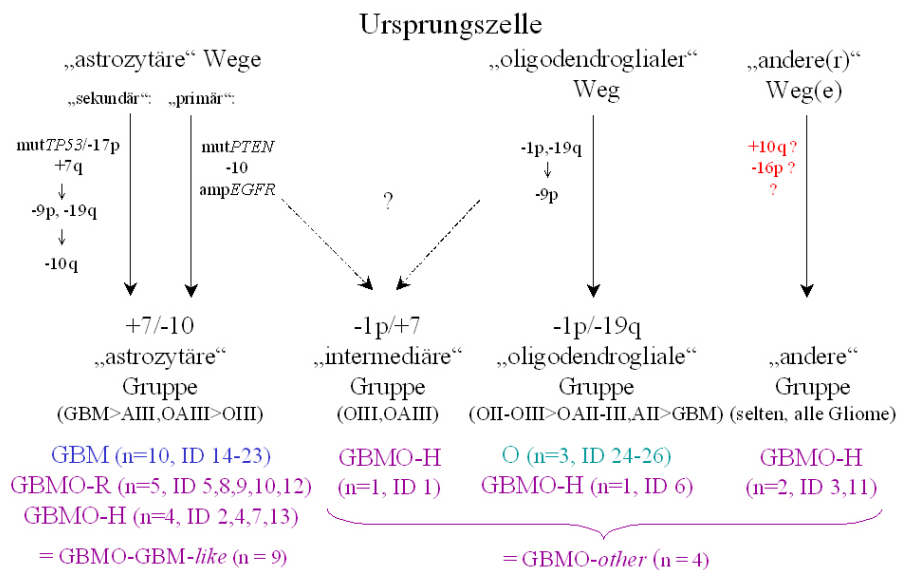


Abb. 5.3: Genetische Einteilung von Gliomen. Die von mir untersuchten GBM und O sind farbig dargestellt. In Klammern unter der genetischen Gruppe sind die aus der Literatur ermittelten histologischen Gruppen von Gliomen angegeben, in denen die entsprechenden Veränderungen ebenfalls gefunden worden, nach Häufigkeit geordnet. Die zwei in der Literatur für primäre und sekundäre Glioblastome (über AII-III) beschriebenen genetischen Entstehungswegen wurden von mir zu einer genetischen Gruppe zusammengefasst, da sie meiner Meinung nach letztendlich beide in eine Gruppe münden. Rot dargestellt sind von mir exklusiv in den beiden Tumoren der Gruppe „andere“ gefundenen Veränderungen. Abkürzungen: O = Oligodendrogliom, OII = WHO-O Grad II, OIII = anaplastisches O (WHO-Grad III), OAI = Oligoastrozytom WHO-Grad II, OAI = anaplastisches Oligoastrozytom (WHO-Grad III), AII = Astrozytom WHO-Grad II, AIII = anaplastisches Astrozytom (WHO-Grad III), GBM = Glioblastom, GBMO-H = Glioblastom mit einer oligodendroglialen Komponente mit Honigwabenzellen, GBMO-R = Glioblastom mit einer oligodendroglialen Komponente mit runden Zellen, n = Anzahl, ID = Identifikationsnummer, mut = Mutation, amp = Amplifikation.

Genetische Unterschiede zwischen den histologischen Subgruppen

Die Ergebnisse der Interphase-FISH-Analyse getrennt für die klassischen GBM und die GBMO sind in Tab. 5.7 zusammengefasst. Während alle untersuchten klassischen GBM genetisch der „astrozytären“ Gruppe entsprachen, galt dies nur für 69% der GBMO,

Tab. 5.7: Genetische Aberrationen in der Interphase-FISH-Untersuchung in GBM und GBMO

Aberrationen	GBMO (n=13)	GBM (n=10)	p
Chromosomale Gewinne			
Chromosome 1	5/13 (38,5 %)	2/10 (20 %)	0,405
Chromosome 1q	7/13 (53,8 %)	2/10 (20 %)	0,197
Chromosome 7q	12/13 (92,3 %)	10/10 (100 %)	1,0
Chromosome 10q	2/13 (15,4 %)	0	0,486
Chromosome 17p	3/13 (23,1 %)	1/10 (10 %)	0,604
Chromosome 18	3/13 (23,1 %)	0	0,229
Chromosome 19	5/13 (38,5 %)	4/10 (40 %)	1,000
Chromosom 21	2/13 (15,4 %)	0	0,486
Chromosomale Verluste			
Chromosome 1p	2/13 (15,4 %)	0	0,486
Chromosome 10q	9/13 (69,2 %)	10/10 (100 %)	0,104
Chromosome 17p	5/13 (38,5 %)	3/10 (30 %)	1,000
Chromosome 18	2/13 (15,4 %)	1/10 (10 %)	1,000
Chromosome 19q	4/13 (30,8 %)	2/10 (20 %)	0,660
Chromosome 21	1/13 (7,7 %)	0	1,000
genetische Gruppen			
+7/-10	9/13 (69,2 %)	10/10 (100 %)	0,104
-1p/-19q	1/13 (7,7 %)	0	1,000
-1p/+7	1/13 (7,7 %)	0	1,000
„andere“	2/13 (15,4 %)	0	0,486

Abkürzungen: GBM = klassisches Glioblastom, GBMO = Glioblastom mit oligodendrogialer Komponente, n = Anzahl, p = Irrtumswahrscheinlichkeit.

jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant ($p = 0,104$). Die Gewinne der Chromosomen 18, 10q und 21 sowie die Verluste von Chromosom 1 und 21 fanden sich nur in der Gruppe der GBMO und nicht bei den klassischen GBM.

Unterschied man jedoch die drei histologischen Subgruppen – GBMO-H, GBMO-R und klassische GBM – ergab sich ein signifikanter Unterschied im Anteil der „astrozytären“ Tumoren ($p = 0,011$). Dieser Unterschied beruhte auf den GBMO-H, von denen sich nur 50 % der „astrozytären“ Gruppe zuordnen ließen, während alle GBMO-R und GBM der „astrozytären“ Gruppe angehörten (siehe Tab. 5.8). Der Gewinn des langen Arms von Chromosom 19 war deutlich seltener in der Gruppe der GBMO-H als in den anderen beiden Gruppen, der Unterschied war jedoch knapp nicht signifikant ($p = 0,053$). Vergleicht man jedoch nur die GBMO-H mit den GBMO-R, ist der Unterschied signifikant ($p = 0,032$). Sonst fanden sich keine weiteren signifikant unterschiedlichen Aberrationen in der Interphase-FISH-Untersuchung. Die wichtigsten Veränderungen, die sich zumindestens tendenziell in den drei histologischen Gruppen unterschieden und z. T. nur in der Gruppe der GBMO-H vorkamen, sind in Tab. 5.8 zusammengefasst.

Der Verlust des *TP53*-Gens fand sich in allen drei histologischen Gruppen gleich häufig

Tab. 5.8: Genetische Aberrationen in der Interphase-FISH-Analyse in GBMO-H, GBMO-R und GBM

Aberrationen	GBMO-H (n = 8)	GBMO-R (n = 5)	GBM (n = 10)	p
-10q	4/8 (50 %)	5/5 (100 %)	10/10 (100 %)	0,011
+7/-10	4/8 (50 %)	5/5 (100 %)	10/10 (100 %)	0,011
+10q	2/8 (25 %)	0	0	0,128
+18	2/8 (25 %)	1/5 (20 %)	0	0,256
-1p	2/8 (25 %)	0	0	0,128
-19q	4/8 (50 %)	0	2/10 (20 %)	0,115
+19q	1/8 (12,5 %)	4/5 (80 %)	4/10 (40 %)	0,053
+21	2/8 (25 %)	0	0	0,128
„andere“	2/8 (25 %)	0	0	0,128

Für signifikante bzw. nahezu signifikante Unterschiede sind die p-Werte **fettgedruckt**. Abkürzungen: GBMO-H = Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente mit Honigwabenstruktur, GBMO-R = Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente mit rundlichen Zellen, GBM = klassisches Glioblastom, n = Anzahl, p = Irrtumswahrscheinlichkeit.

(p = 0,911).

Genetische Unterschiede zwischen GBMO-H und GBMO-R in der CGH

Mittels CGH-Analyse fand ich zusätzliche Aberrationen in den GBMO. Dabei zeigten sich weitere tendenzielle Unterschiede zwischen den GBMO-H und GBMO-R. So wiesen die GBMO-R häufiger Amplifikationen von 7p12 (*EGFR*) auf als die GBMO-H (p = 0,072) sowie häufiger Deletionen auf den kurzen Armen der Chromosomen 9 und 11 (p = 0,222). Im Gegensatz dazu fanden sich Gewinne auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 ausschließlich in den GBMO-H, und zwar in vier von sieben Fällen (p = 0,081). Die GBMO-H zeigten außerdem häufig den Gewinn des langen Arms von Chromosom 6 sowie den Verlust der Chromosomen 14, 16, 18, 19, 20 und X und des kurzen Arms von Chromosom 3. Diese Aberrationen wurden nicht in GBMO-R gesehen. Ein Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17 hingegen fand sich in beiden Gruppen gleich häufig.

Zwar unterschied sich der ANCA-Index der beiden Gruppen insgesamt nicht (GBMO-H = 13,57, GBMO-R = 13), die GBMO-H hatten jedoch im Mittel etwa genauso viel Verluste (Mittelwert = 6,86) wie Gewinne (Mittelwert = 7,14), während die GBMO-R durch mehr Gewinne (Mittelwert = 8,40) als Verluste (Mittelwert = 4,80) gekennzeichnet waren. Verglich man jeweils nur die astrozytären und oligodendroglialen Anteile der zwei Gruppen miteinander, so zeigte sich, dass die GBMO-R in ihrem oligodendroglialen Anteil signifikant mehr Amplifikationen aufweisen als die GBMO-H (p = 0,028). Die GBMO-H dagegen weisen mehr Verluste in ihrem astrozytären Anteil auf als die GBMO-R (p = 0,056).

Unterschiede zwischen den genetischen Gruppen in den GBMO

Um herauszufinden, ob die eben beschriebenen Unterschiede zwischen GBMO-H und GBMO-R evtl. auf den vier genetischen Gruppen beruhen, wurden als nächstes die genetischen Gruppen auf genetische Unterschiede hin verglichen. Meine Analysen ergaben, dass auf Grund der genetischen Aberrationen alle GBMO-R ($n = 5$) und die Hälfte der GBMO-H (4/8) wie die klassischen GBM der „astrozytären Gruppe“ zugeordnet werden können. Deshalb werden diese neun GBMO im Folgenden als GBMO-GBM-*like* bezeichnet. Vier GBMO-H (ID 1,3,6,11) entsprachen genetisch jedoch nicht den GBM (siehe S.58). Diese vier GBMO-H werden deshalb als GBMO-*other* zusammengefasst. Ich wähle hier die englische Bezeichnung, um diese Tumoren von der genetischen Gruppe „andere“ abzugrenzen.

Der ANCA-Index der GBMO-GBM-*like* (12,75) und der GBMO-*other* (14,25) unterschied sich nicht, jedoch zeigte sich, dass die GBMO-*other* durch gleich viel Verluste (Median = 7,75) wie Gewinne (Median = 7,25) gekennzeichnet waren und die GBMO-GBM-*like* wie die GBMO-R mehr Gewinne (Median = 7,88) als Verluste (Median = 5) aufwiesen. Die GBMO-GBM-*like* hatten deutlich weniger Verluste als die GBMO-*other* ($p = 0,109$).

Der Gewinn des langen Arms von Chromosom 19 (5/9) sowie Amplifikationen von 7p12 (*EGFR*) (5/8) fanden sich ausschließlich in der Gruppe der GBMO-GBM-*like* und nie in den GBMO-*other* ($p = 0,105$ und $0,081$). Weitere häufige Veränderungen, die sich nur in der Gruppe der GBMO-GBM-*like* fanden, waren: +6p (3/8), -11 (3/8) und andere, welche in Tab. 5.9 zusammengefasst sind.

Einziger signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen war der Verlust von Chromosom X, welcher sich ausschließlich in den GBMO-*other* (3/4) fand ($p = 0,018$). Weitere Veränderungen ausschließlich in den GBMO-*other* waren ein Verlust auf 3p (2/4) und Verlust des kurzen Arms von Chromosom 16 (2/4). Ein Gewinn auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 fand sich häufiger in den GBMO-*other* als in den GBMO-GBM-*like*, auch wenn der Unterschied knapp nicht signifikant war ($p = 0,061$).

Der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 9 hingegen fand sich in beiden Gruppen gleich häufig ($p = 1,000$).

Es traten noch weitere, seltene Veränderungen in jeweils nur einer der beiden Gruppen auf. Alle unterschiedlichen Veränderungen sind in Tabl. 5.9 aufgeführt.

Unterteilt man die GBMO in die vier von mir gefundenen genetischen Gruppen (vgl. Abb. 5.3), also „astrozytäre“, „oligodendrogliale“, „intermediäre“ und „andere“, so werden einige der eben beschriebenen genetischen Veränderungen signifikant: Ein Verlust des

Tab. 5.9: Genetische Unterschiede zwischen GBMO-*other* und GBMO-GBM-*like* in der CGH-Analyse

Aberrationen	GBMO- <i>other</i> (n = 4)	GBMO-GBM- <i>like</i> (n = 8 bzw. 9) ¹	p
Häufig verändert in GBMO-GBM- <i>like</i>	+2q22-qter	2/8 (25 %)	0,515
	+6p	3/8 (37,5 %)	0,491
	amp7p12 (<i>EGFR</i>)	5/8 (62,5 %)	0,081
	-11	3/8 (37,5 %)	0,491
	+13	2/8 (25 %)	0,515
	-15q	2/8 (25 %)	0,515
	+17	2/8 (25 %)	0,515
	+19	5/9 (55,6 %)	0,105
	+20	2/8 (25 %)	0,515
	+X	2/8 (25 %)	0,515
	-3p12-qter	2/4 (50 %)	0,091
Häufig verändert in GBMO- <i>other</i>	-8p	2/4 (50 %)	0,236
	+9p	3/4 (75 %)	0,067
	+10q23	2/4 (50 %)	0,077
	-15q15	2/4 (50 %)	0,547
	-16p	2/4 (50 %)	0,091
	-17p	3/4 (75 %)	0,217
	+18q	2/4 (50 %)	0,203
	-X	3/4 (75 %)	0,018
jeweils nur einmal	amp7p15-21,+8q21.23,+9p, +10q,amp11q14-22,-12p, -16q,amp17q22-qter	amp1q31-32,-2,+2,-5q33-qter,-6p21, amp7q11-21,-11p,+12p,amp12p13, amp12q13-14,+13q,+15,+16,amp18 q11,+20p,amp20p12,amp20q13, -21q21,amp21p21-q21	

¹n = 8 wenn die CGH-Ergebnisse verwendet wurden, n = 9 wenn die Ergebnisse der Interphase-FISH-Untersuchungen verwendet wurden. Signifikante Unterschiede oder tendenzielle Unterschiede sind fett markiert. Abkürzungen: p = Irrtumswahrscheinlichkeit, n = Anzahl.

kurzen Arms von Chromosom 3 und des X-Chromosoms fand sich ausschließlich in der „oligodendroglialen“ sowie der Gruppe „andere“ ($p = 0,038$ und $0,007$). Den Verlust des kurzen Arms von Chromosom 16 sowie einen Gewinn auf dem langen Arm von Chromosom 10 wies ausschließlich die Gruppe „andere“ auf ($p = 0,007$).

Vereint man die Gruppe der klassischen GBM mit der der GBMO-GBM-like und vergleicht sie mit den GBMO-other, also die Tumoren mit +7/-10 mit denen ohne dieses genetische Profil, verstärken sich ebenfalls einige Unterschiede: Der Gewinn von Chromosom 18 sowie der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17 war deutlich häufiger in den GBMO-other ($p = 0,067$ bzw. $p = 0,068$).

Eine Übersicht der in der CGH-Analyse gefundenen Aberrationen getrennt nach den vier genetischen Gruppen gibt Abb. 5.4.

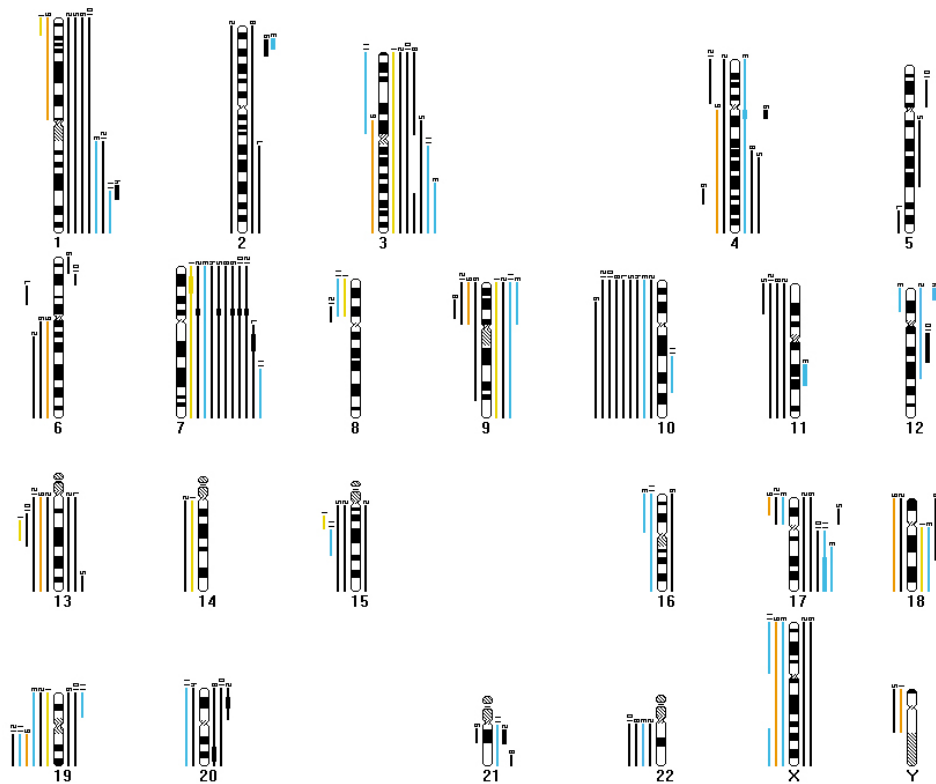


Abb. 5.4: Aberrationen von 12 GBM-O in der CGH-Untersuchung. schwarz = GBMO-GBM-like („astrozytäre“ Gruppe), orange, gelb und blau: GBMO-other, orange = „oligodendrogliale“, gelb = „intermediäre“, blau = „andere“ Gruppe. Verluste sind links, Gewinne rechts der Chromosomen dargestellt. Dicke Balken stellen Amplifikationen dar.

Vergleich des oligodendroglialen und des astrozytären Tumoranteils der GBMO

In elf Tumoren wurde der oligodendrogliale und der astrozytäre Anteil mittels Interphase-FISH- bzw. CGH-Analyse untersucht und miteinander verglichen. In den sechs GBMO-

GBM-*like*, den GBMO, die der „astrozytären“ Gruppe entsprachen, von denen beide Anteile untersucht werden konnten, waren der „oligodendrogliale“ und der „astrozytäre“ Anteil in Bezug auf das Auftreten des Gewinns von Chromosom 7 und des Verlusts von Chromosom 10 identisch. Ebenso verhielt es sich bei dem GBMO der „oligodendroglialen“ Gruppe (ID 6) mit dem kombinierten Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19 und bei dem „intermediären“ GBMO (ID 1) für den Gewinn von Chromosom 7 und Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1. Die beiden GBMO, die der Gruppe „andere“ zugeordnet waren (ID 3 und 11), wiesen den Gewinn von Chromosom 7 und 10 nur im oligodendroglialen Anteil auf, zeigten jedoch eine Reihe von anderen übereinstimmenden Aberrationen in beiden Tumoranteilen, die auch in beiden Tumoren vorkamen: den Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17, Gewinn des langen Arms von Chromosom 3, des kurzen Arms von Chromosom 9 sowie von Chromosom 1.

Zusätzlich zu den die genetischen Subtypen bestimmenden Aberrationen fanden sich weitere Chromosomenveränderungen, die immer in beiden Tumoranteilen übereinstimmten. Für die sechs GBMO mit +7/-10 waren das: +1(3x),-22(3x),-9p(3x),+X(2x),-2,amp 2p22-23,amp4q12,+5q,amp7q12,-8p,+9q,-14,-18,-21,-Y. Bei den 1p/19q-Tumor stimmten nur 1p/19q überein. Bei den „anderen“ waren es noch: -3p,-8p,-15q,-16q,+17q,-19q,-20,+21,-X. Bei dem -1p/+7 Tumor waren es: +3,+6q,amp7p15-21,-8p,+9,-14,-Y.

Trotz dieser genetischen Gemeinsamkeiten waren allerdings beide Tumoranteile nie identisch, denn es fanden sich immer zusätzliche, meist nur einmal auftretende Aberrationen, die entweder nur im oligodendroglialen bzw. nur im astrozytären Anteil detektiert worden. Dabei handelte es sich bei den GBMO-GBM-*like* um folgende Veränderungen: oligodendroglialer Anteil: (+2,+5p,+9p,+12pter-q21,amp18q11,amp20q,-20,+21q22) astrozytärer Anteil: (+4q25-qter,+13q33-qter(2x),+15,-19q(2x),amp20p,+21,amp21q). Bei den zwei GBMO der Gruppe „andere“ waren es im astrozytären Anteil: (+4,amp4q12,+8q21-23,-10,amp11q14-22,-12,-16p(2x),-22) und im oligodendroglialen Anteil: (+10q(2x),+7q(2x),+1p,amp2p23,-9q,+17,+19p,+21,-X). Das „oligodendrogliale“ GBMO zeigte im astrozytären Anteil zusätzlich folgende Verluste: -3p12-qter,-4q,-6q,-9p,-13,-18 und im oligodendroglialen Anteil zusätzlich den Verlust von 17p und X.

Wird auf die Unterteilung in Subklassen verzichtet, zeigte sich ein Gewinn auf Chromosom 13 und der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 16 in je zwei Tumoren nur im astrozytären Anteil.

Außerdem fanden sich noch Aberrationen, die sowohl in beiden Anteilen, als auch nur in einem der beiden Anteile vorkamen, wie z. B. der Gewinn von Chromosom 3, 17, 19,

20, der Verlust von 6q, 17p und Chromosom 13 sowie *EGFR* Amplifikationen.

Es gab jedoch keine rekurrenten Aberrationen, die eine klare Unterscheidung zwischen astrozytärem und oligodendroglialem Anteil in den hier untersuchten Tumoren erlauben würden.

Bezüglich der Ploidie war ebenfalls kein wesentlicher Unterschied zwischen den oligodendroglialen und astrozytären Tumoranteilen zu erkennen. Ein GBMO-GBM-*like* war im astrozytären Anteil diploid und im oligodendroglialen Anteil triploid, vier waren in beiden Anteilen triploid und eines in beiden Anteilen diploid. Das „oligodendrogliale“ GBMO war im oligodendroglialen Anteil diploid und im astrozytären Anteil triploid. Die beiden „anderen“ GBMO waren jeweils in beiden Anteilen triploid, und das „intermediäre“ GBMO in beiden Anteilen diploid.

Die Interphase-FISH-Untersuchung zeigt nicht nur, ob in einem Tumorgewebe eine Region gewonnen oder verloren ist. Im Gegensatz zu anderen Methoden kann die genaue Zusammensetzung eines Tumors aus verschiedenen Zellpopulationen (Zellklonen) ermittelt werden. Um alle diese Informationen aus der Interphase-FISH-Analyse darstellen zu können, wurde ein Programm geschrieben, welches die Anzahl aller vorhandenen Zellklone zählt und deren Häufigkeiten in Form von verschiedenen großen Kugeln in einem dreidimensionalen Diagramm darstellt. Die Abbildungen 5.5 und 5.6 zeigen dies jeweils am Beispiel eines GBMO-R (ID 5) und eines GBMO-H (ID 6).

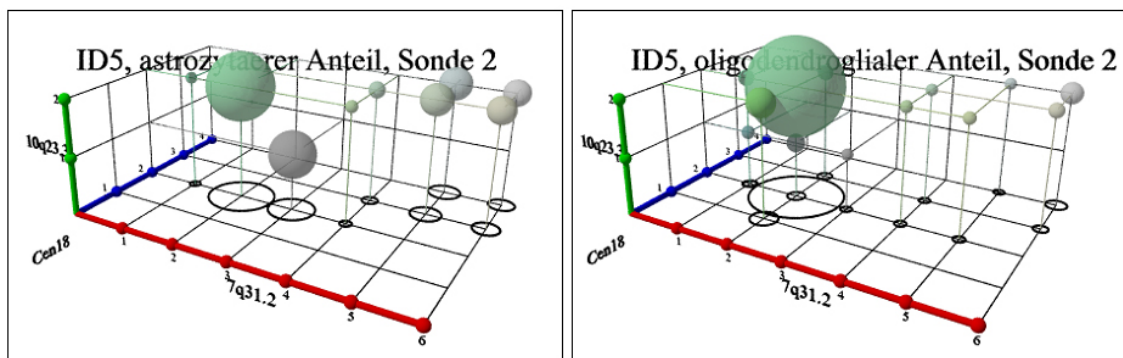
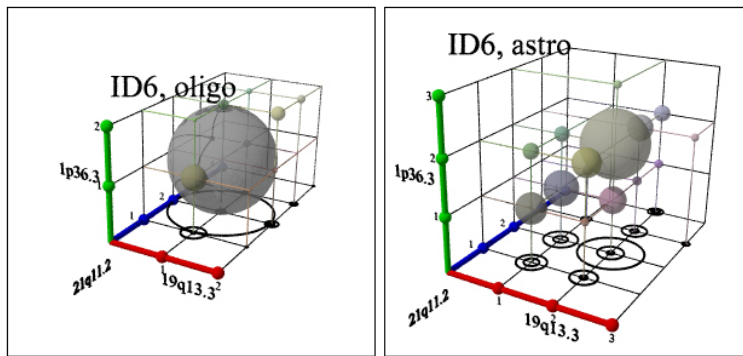


Abb. 5.5: Kugeldiagramme des astrozytären und oligodendroglialen Anteils beispielhaft für ein GBMO (ID5): Die Kugeln entsprechen den unterschiedlichen Zellpopulationen im Tumor, wobei die Koordinaten die Anzahl der Signale pro Sonde angeben, und die Größe der Kugel den Anteil der Zellpopulation im Tumor widerspiegelt. Den größten Anteil haben jeweils Zellen ohne Aberrationen (jeweils 2 Signale, größte Kugeln links und rechts), deren Anteil ist im oligodendroglialen Anteil (rechts) größer. Im astrozytären Anteil (links) besteht die zweitgrößte Population aus Tumorzellen mit +7q/-10q. Im oligodendroglialen Anteil findet sich eine kleine Population nur mit -10q, sowie mehrere mit +7q, jedoch insgesamt weniger Zellen mit -10q und +7q als im astrozytären Anteil.

So stellte ich fest, ob sich der Anteil der Zellen mit Aberrationen bei den oligodendroglialen und den astrozytären Tumoranteilen unterschied. Dies war in acht Tumoren der Fall (Tab. 5.10). Dabei zeigte sich, dass der Tumor (ID 6) mit kombiniertem Verlust von 1p und 19q („oligodendroglialer“ Marker) diese Veränderungen im oligodendroglialen

**Abb. 5.6: Kugeldiagramme für ID6:**

Der oligodendroglialen Anteil (links) besteht überwiegend aus Zellen mit -1p/-19q (große Kugel). Der astrozytären Anteil (rechts) zeigt v. a. normale Zellen (Koordinaten 2-2-2, größte Kugel) sowie drei kleinere Zellpopulation mit -1p/-19q, nur mit -1p oder nur mit -19q (blaue, grüne und lilafarbene [zweit-, dritt- und viertgrößte] Kugeln).

Anteil in einem größeren Anteil der Zellen aufwies als im astrozytären Anteil. Bei zwei Tumoren wurde ein Verlust von 17p („astrozytärer Marker“) gefunden (ID 11,12). Jener fand sich häufiger in den Zellen des astrozytären Anteils. Dagegen war der Gewinn von Chromosom 7 und Verlust von Chromosom 10 in manchen Tumoren im oligodendroglialen Anteil und in manchen Tumoren im astrozytären Anteil häufiger.

5.2.3 Einfluss klinischer, histologischer und genetischer Merkmale auf die Überlebenszeit

Therapie: Den größten Einfluss auf die Überlebenszeit der 23 Patienten mit einem Glioblastom hatte die Strahlentherapie. Patienten, die postoperativ bestrahlt wurden, hatten mit 373 vs 102 Tagen eine signifikant längere mediane Überlebenszeit als Patienten ohne Bestrahlung ($p = 0,007$) (Abb. 5.7A). In multivariaten Analysen unter Einschluss von Alter, Geschlecht, Histologie, Therapie sowie Genetik wurde ein von anderen Parametern unabhängiger prognostischer Einfluss der Bestrahlung nachgewiesen, wobei die Strahlentherapie den prognostischen Faktor mit der besten Signifikanz darstellte ($p = 0,001$). Eine zusätzliche Chemotherapie allgemein bzw. mit Temodal hatte dagegen keinen Einfluss auf die Überlebenszeit ($p = 0,275$ bzw. $0,2238$).

Histologie: Patienten mit einem Glioblastom, welches eine oligodendrogliale Komponente aufwies (GBMO) überlebten mit durchschnittlich 404 vs 282 Tagen länger als Patienten mit einem klassischen GBM ($p = 0,112$). Wurden die vier Patienten aus der Berechnung ausgeschlossen, die keine Strahlentherapie erhielten (ID 1,2,8,14), fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientenkollektiven (medianes Überleben 479 vs 290 Tage, $p = 0,027$) (Abb. 5.7B). Es gab jedoch keinen Unterschied im Überleben der Patienten mit einem GBMO-H und einem GBMO-R ($p = 0,8698$). In multivariaten Analysen, welche Therapie, Alter, Geschlecht und Genetik einschlossen, zeigte

Tab. 5.10: Abberationen mit unterschiedlicher Häufigkeit in den verschiedenen Tumoranteilen

ID	Histologie	Aberration	Anteil der Zellen mit Aberration im astrozytären Anteil (in %)		Anteil der Zellen mit Aberration im oligodendroglialen Anteil (in %)
2	GBMO-H	-10q	51 %	>	42 %
		+7q	71 %	>	51 %
		-cen18	56 %	>	33 %
		-19q	51 %	>	39 %
3	GBMO-H	+1p32	78 %	>	36 %
		+1q32	49 %	<	68 %
5	GBMO-R	+7	68 %	>	40 %
		-10	62 %	>	48 %
6	GBMO-H	-1p	44 %	<	68 %
		-19q	38 %	<	72 %
8	GBMO-R	+7q	50 %	<	61 %
9	GBMO-R	+7q	69 %	<	90 %
		-10q	36 %	<	56 %
		+1	54 %	<	88 %
		+19q	53 %	<	76 %
11	GBMO-H	-17p	38 %	>	28 %
		-19q	51 %	<	74 %
		+21	29 %	<	44 %
12	GBMO-R	-17p	83 %	>	64 %

Zeichenerklärung: > = Anteil der Zellen mit Abberation ist im astrozytären Anteil größer als im oligodendroglialen Anteil, < = Anteil der Zellen mit Abberation ist im astrozytären Anteil kleiner als im oligodendroglialen Anteil. Abkürzungen: GBMO-H = Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente und Honigwabenzellen, GBMO-R = Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente und rundlichen Zellen

sich ein signifikanter Einfluss der histologischen Einteilung in GBMO und GBM auf das Überleben ($p = 0,005$).

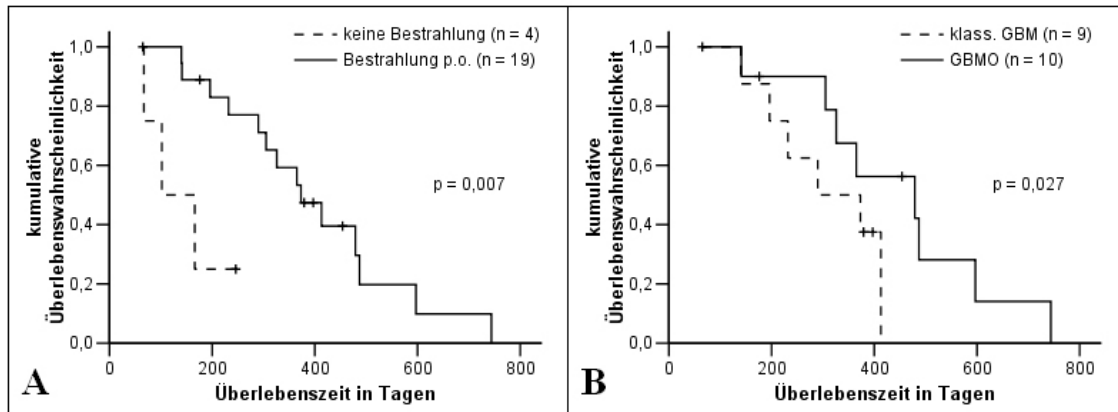


Abb. 5.7: Einfluss von Therapie und Histologie auf das Überleben: Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patienten mit einem Glioblastom. (A): mit und ohne postoperative Bestrahlung (B): Patienten mit einem klassischen GBM vs. GBMO (Patienten ohne postoperative Bestrahlung ausgeschlossen). Abkürzungen: GBM = Glioblastom, GBMO = Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente, n = Anzahl, p. o. = postoperativ.

Alter: Patienten mit einem Alter unter 60 Jahren überlebten mit durchschnittlich 414 Tagen gegenüber 284 Tagen in der Gruppe der über 60-Jährigen signifikant länger ($p = 0,047$), jedoch bestätigte sich dies nicht in den multivariaten Analysen ($p = 0,930$).

Geschlecht: Das Geschlecht der Patienten hatte weder in der univariaten, noch in multivariaten Analysen einen Einfluss auf das Überleben der Patienten ($p = 0,663$).

Einteilung in vier genetische Gruppen: Es zeigte sich, dass die Einteilung in vier genetische Gruppen (vgl. S.58) einen signifikanten Einfluss auf das Überleben hatte ($p = 0,022$), und zwar überlebten die Patienten mit Tumoren, die der Gruppe „andere“ zugeordnet waren (ID 3,11), am längsten (mittlere Überlebenszeit 451 Tage), während der Patient mit dem Tumor mit den „intermediären“ Veränderungen (ID 1) die kürzeste Überlebenszeit zeigte (102 Tage). An zweiter Stelle stand der Patient dessen Tumor die „oligodendroglialen“ Veränderungen aufwies (ID 6, 365 Tage) gefolgt von Patienten mit Tumoren der „astrozytären“ Gruppe (357 Tage). Dieser Unterschied bestätigte sich jedoch nicht in den multivariaten Analysen.

Genetische Abberationen in der Interphase-FISH-Analyse: Von den 23 Patienten mit einem GBM hatten Patienten mit einem Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17 eine kürzere mediane Überlebenszeit (medianes Überleben 326 vs 413 Tage). Dieser Einfluss war noch deutlicher in der Gruppe der 10 klassischen GBM (140 vs 373 Tage, $p = 0,249$). In multivariaten Analysen war der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17 der einzige signifikante genetische prognostische Faktor der von mir gefunden wurde ($p = 0,036$). Der Verlust von 1p hatte ebenfalls einen tendenziell schlechten Ein-

fluss auf die Prognose ($p = 0,177$), allerdings beruhte dieser v. a. auf dem „intermediären“ Glioblastom. Ein *Verlust* auf dem *langen* Arm von Chromosom 19 hatte keinen Einfluss auf die Prognose der Patienten mit einem GBM oder GBMO.

In der Gruppe der 10 klassischen GBM war ein *Gewinn* auf dem *langen* Arm von Chromosom 19 mit einem signifikant kürzeren medianen Überleben verbunden (140 vs 373 Tage, $p = 0,02$), während im Gegensatz dazu in der Gruppe der GBMO das mediane Überleben bei dieser Veränderung länger war (487 vs 305 Tage, $p = 0,160$). Der Verlust von Chromosom 18 zeigte eine Tendenz zu einer kürzeren Überlebenszeit nur in der Gruppe der GBMO (166 vs 479 Tage, $p = 0,231$).

Genetische Aberrationen mittels CGH-Untersuchung: In der CGH-Untersuchung von 12 GBMO zeigte sich, dass der *Verlust* des *gesamten* Chromosoms 19 mit einem signifikant schlechteren Überleben verbunden war (166 vs 479 Tage, $p = 0,005$), während Patienten mit einem *Verlust nur des langen Arms* von Chromosom 19 tendenziell länger überlebten (479 vs 305 Tage, $p = 0,258$). Der Gewinn des langen Armes von Chromosom 6 wurde in 3 Tumoren gefunden und war mit einem signifikant kürzeren Überleben verbunden (166 vs 479 Tage, $p = 0,005$). Der Gewinn von Chromosom 13 und der Verlust von Chromosom 14 wurden jeweils in zwei GBMO gesehen und waren beide mit einem signifikant kürzeren Überleben assoziiert (141 vs 479 Tage, $p = 0,012$ und 102 vs 479 Tage, $p = 0,003$). Abberationen, die jeweils nur in einem Tumor auftraten und mit einem signifikant kürzerem Überleben assoziiert waren, sind: amp7p15 ($p = 0,001$) sowie -5q33-qter,-6p21,amp7q11-21 (jeweils $p = 0,038$). Keine der anderen genetischen Veränderungen in der CGH-Analyse hatte einen signifikanten Einfluss auf die Prognose.

Einteilung der GBMO in Lang- und Kurzzeitüberleber: Ich teilte die mit der CGH-Technik untersuchten GBMO nach der Überlebenszeit in „Kurzzeitüberleber“ (Überlebenszeit <1 Jahr, ID 1,2,3,5,7,8,9) und „Langzeitüberleber“ (Überlebenszeit >1 Jahr, ID 4,10,11,12) ein. Zwar werden in der Regel in der Literatur Glioblastompatienten mit einem Überleben von mehr als 2 bzw. 3 Jahren als Langzeitüberleber bezeichnet (Kraus et al. 2000b, Burton et al. 2002a), hier werden jedoch aus einem großen Patientengut diese Patienten retrospektiv selektiert. Dagegen zeigen große populationsbasierte Studien, dass die mittlere Überlebenszeit bei unselektiertem Patientengut von Glioblastompatienten deutlich unter einem Jahr liegt (4,9 Monate) (Ohgaki et al. 2004), so dass ich bei dem von mir untersuchten, ebenfalls unselektierten Patientengut, die Grenze schon bei einem Jahr festlegte.

Der einzige signifikante Unterschied zwischen den beiden Gruppen war der alleinige Verlust des langen Arms von Chromosom 19 (mit Erhalt des kurzen Arms von Chro-

mosom 19), welcher nur in der Gruppe der Langzeitüberleber vorkam (3/5; $p = 0,045$). Dagegen fand sich der Verlust des *gesamten* Chromosom 19 nur in der Gruppe der Kurzzeitüberleber (2/7). Weitere häufige Veränderungen, die nur in der Gruppe der Kurzzeitüberleber vorkamen und eventuell mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind, waren: $\text{amp}2\text{p}22\text{-}23(2/7), +2\text{q}(2/7), +4\text{q}(3/7), \text{amp}4\text{q}12(2/7), -4\text{q}(2/7), +6\text{q}(3/7), +13\text{q}(3/7), -14(2/7), +17\text{p}(3/7), +18\text{q}(3/7), +\text{X}(2/7), -\text{Y}(2/7)$. Die Amplifikation von 4q12 (*PDGFRA*) trat in beiden Fällen zusammen mit der Amplifikation von 2p22-23 auf. Es fanden sich weitere Veränderungen, die nur in der Gruppe der Langzeit- bzw. Kurzzeitüberleber vorkamen, jedoch jeweils nur einmal. Der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 9, Amplifikationen des *EGFR*-Gens ($\text{amp}7\text{p}12$) sowie Gewinn von Chromosom 7 und Verlust von Chromosom 10 war in beiden Gruppen gleich häufig.

Der ANCA-Index war in der Gruppe der Kurzzeitüberleber höher als in der Gruppe der Langzeitüberleber (15 vs 11). Dies lag v. a. an der Anzahl der Gewinne (9,14 vs 5,60), während die Anzahl der Verluste in beiden Gruppen gleich war (jeweils 6). Betrachtet man die astrozytären Anteile getrennt, fand sich sogar ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Gewinne (7,83 vs 3,50, $p = 0,05$) zwischen den Kurzzeit- und Langzeitüberlebenden, während sich zwischen den oligodendroglialen Anteilen kein Unterschied zeigte.

Den größten Einfluss auf die Überlebenszeit der in dieser Arbeit untersuchten 23 Glioblastompatienten hatte zum einen die Durchführung einer Strahlentherapie und zum anderen der Nachweis einer oligodendroglialen Komponente, wobei beide mit einer signifikant günstigeren Prognose verbunden waren ($p = 0,001$ bzw. $0,005$). Zusätzlich wurden genetische Veränderungen identifiziert, welche signifikante, prognostische Marker in den Glioblastompatienten darstellten.

6 Diskussion

6.1 Methodischer Teil

6.1.1 Optimierung der Interphase-FISH-Analyse

Die Interphase-FISH-Untersuchung stellt eine für die Routinediagnostik vielversprechende Methode zur molekulargenetischen Diagnostik von Tumoren dar. Eine Reihe von Genen und Zentromeren sind bereits als kommerzielle FISH-Proben erhältlich. Diese sind nach eigenen Erfahrungen von unterschiedlich guter Qualität. Für die meisten Fragestellungen, auch für Regionen, die für diese Arbeit wichtig waren, gibt es solche Sonden allerdings noch nicht. Für einen zukünftigen Einsatz in der Routinediagnostik müssen geeignete DNA-Sonden mit einer kostengünstigen, leicht durchzuführenden und gut reproduzierbaren Methode in großen Mengen markiert werden können. Dabei soll die Methode gute Signalintensitäten ohne störenden Hintergrund liefern. Dies hat insbesondere bei der Hybridisierung auf komplexere Gewebe – z. B. Paraffinschnitte – größte Bedeutung. Ein Teil dieser Arbeit bestand deshalb darin, die Interphase-FISH-Methode zu optimieren und geeignete Markierungsmethoden zu vergleichen bzw. zu entwickeln.

Untersuchung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Hybridisierung

Anhand der Nicktranslation wurde der Einfluss verschiedener Parameter (DNA-Menge, Fragmentlänge, Fluorochrome u. a.) auf die Hybridisierung getestet:

Einfluss der eingesetzten DNA-Menge: Bei einem Einsatz von 2000 bis 200 ng Sonden-DNA pro Hybridisierung ergab sich kein Unterschied in den Signalintensitäten. Erst nach Einsatz von nur 100 ng DNA kam es zu einer Minderung der Signalintensität. Diese Beobachtung ist lediglich ein Effekt der Kinetik, da die Limitierung der Hybridisierungs-Reaktion im Target liegt (je nach Zellzyklusphase zwei oder vier Kopien der Zielsequenz): Je niedriger die Konzentration an Sonden-DNA am Ort der Hybridisierung, desto langsamer läuft die Bindungsreaktion der DNA ab (Robinson 2001).

Durch Ausdehnung der Hybridisierungszeit könnten also auch geringere DNA-Mengen das gleiche Ergebnis liefern. Das wäre jedoch für einen diagnostischen Test nicht sinnvoll, da man hier möglichst schnell ein Ergebnis wünscht. Ich setzte darum in allen weiteren Experimenten 1000 ng DNA ein.

Einfluss der DNA-Fragmentlänge: Eine Sonden-Länge von 400-800 bp brachte das beste Hybridisierungsergebnis. War die Sonden-DNA länger (über 1000 bp), fand sich ein granulierter Hintergrund auf Kernen und Chromosomen, der eine eindeutige Auswertung verhinderte. Dies lässt sich damit erklären, dass zu lange DNA-Sonden nicht bis zur Zielsequenz durchdringen können, sondern lediglich an DNA-Schlaufen binden, welche aus Kernen und Chromosomen heraustreten (Spector et al. 1997). War die Sonden-DNA dagegen kürzer als 400 bp, verminderte sich die Signalintensität. Dies lässt sich damit erklären, dass ein größerer Teil der kurzen Sequenzen bei der DNA-Fällung verloren geht.

Benutzung eines Pools aus BAC-Klonen: Die Länge der markierten Zielsequenzen erklärt, dass ich durch Verwendung eines Pools aus BAC-Klonen, die überlappend kartieren, eine deutliche Verstärkung der Signalintensität gegenüber der eines Einzel-Klons erzielen konnte. Dieser Effekt fand sich jedoch nur bei einem Pool aus 2 oder 3 Klonen. Bei Verwendung von 4 Klonen kam es sogar zu einem leichten Abfall der Signalintensität. Dies führe ich darauf zurück, dass die überspannte Fläche so groß wird (ab etwa 4 BAC-Klonen werden rund 1 Mb überspannt), dass die größtmögliche Signalintensität an einem Bildpunkt überschritten wurde.

Direkte und indirekte Markierung mit verschiedenen Fluorochromen: Die direkte Markierung von DNA durch an dUTPs konjugierte Fluorochrome ergab für die drei untersuchten Spektralbereiche (rot: TR, SO; grün: FITC, A488, R110; nahe Infrarot: Cy5) ein nur sehr schwaches Sonden-Signal. Die Intensität der Signale war für eine eindeutige Identifizierung an Paraffinmaterial zu gering, da Gewebe insbesondere im grünen und roten Spektralbereich eine deutliche Eigenfluoreszenz aufweist (Szöllösi et al. 1995). Eine indirekte Markierung mit einem Detektionsschritt führte zu einer deutlichen Signalverstärkung. Dies begründet sich zum einen damit, dass pro markiertem dUTP bei Direktmarkierung genau ein fluoreszierendes Molekül gebunden ist, während an einem detektierendem Molekül 3 bis 4 Fluorochrome konjugiert sind. Zum anderen ist die Einbaurate auf Grund der Substratspezifität der Polymerase und der Größe von Fluorochromen-konjugierten-dUTPs womöglich niedriger als z. B. von Biotin-dUTPs (Waggoner 2006). Eine Ausnahme stellte die Direktmarkierung mit Tamra-dUTP (roter Spektralbereich) dar: Die Signalintensität lag deutlich über der Intensität der anderenen

getesteten Fluorochrome für Direktmarkierung und entsprach der Intensität einer indirekten Markierung. Dies liegt wahrscheinlich an den speziellen Fluorochromeigenschaften sowie der Polymerasespezifität. Der Vorteil der direkten Markierung ist die Einsparung des Detektionsschritts und die Vermeidung von unspezifischen Bindungen detektierender Moleküle. Der Hintergrund war jedoch bei direkter und indirekter Markierung mit einem Detektionsschritt etwa gleich niedrig, so dass eine unspezifische Bindung hier keinen großen Einfluss in der Praxis hatte. Ein zweiter Detektionsschritt führte zwar zu einer weiteren Verstärkung der Signalintensität, hier erzeugte dies jedoch auf Grund der unspezifischen Bindung der Detektionsmoleküle einen so starken Hintergrund, dass eine eindeutige Signalidentifizierung nicht mehr möglich war.

Optimierung des Hybridisierungsprotokolls zur Verminderung des Hintergrunds: Eine zusätzliche Ethanol-fällung der DNA zur weiteren Reinigung von evtl. störenden und zum Hintergrund beitragenden Resten verlängerte die Gesamtprozedur und führte zu einem messbaren Verlust von DNA, ohne die Hybridisierungsqualität zu verbessern. Dies bestätigte diesbezügliche Beobachtungen anderer Untersucher (<http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/fi10.html>).

Auch eine Behandlung der Objektträger mit Gelatine, die eine unspezifische Bindung von Molekülen verhindern sollte, führte zu keiner Veränderung. Die Verwendung von Streptavidin-FITC statt Avidin-FITC, welches laut Angaben des Herstellers (*Jackson ImmunoResearch*) eine höhere Spezifität für die Bindung an Biotin besitzt, führte ebenfalls zu keiner Verminderung des Hintergrunds.

Insgesamt ist jedoch anzumerken, dass die Qualität der Hybridisierung nach meinem Protokoll auf Metaphasechromosomen sehr gut war mit einem nur sehr geringen Hintergrund, so dass evtl. unter diesen Umständen keine Verbesserung mehr zu erkennen war. Weitere Schritte sollten deshalb an reproduzierbarem Paraffinmaterial getestet werden.

Vergleich verschiedener Markierungsmethoden

Nicktranslation: Mit der Nicktranslation (Koch et al. 1986) erzielte ich Hybridisierungsergebnisse, deren Qualität der von kommerziellen Proben entsprach bzw. diese übertraf. Die Nachteile der Nicktranslation liegen allerdings in den vergleichsweise hohen Kosten (siehe S.77), einem aufwändigen Protokoll mit genauer Einstellung der benötigten DNase-Menge und des Verhältnisses von DNase und Polymerase (Sambrook und Russell 2001) sowie einer großen Menge an benötigter BAC-DNA, da keine Amplifizierung stattfindet. Darum testete ich alternative Markierungsmethoden, die für eine

Anwendung in der Diagnostik geeignet erschienen.

DOP- und LIG-PCR: Ich amplifizierte BAC-DNA sowohl mit LIG- als auch mit DOP-PCR. Der Einsatz von jeweils 5 μ l PCR-Produkt in eine Nicktranslation erbrachte Signale, die ebenso intensiv waren wie bei Einsatz von 200-1000 ng nichtamplifizierter BAC-DNA. Somit lässt sich durch die getesteten PCR-Methoden die benötigte DNA-Menge zur Sondenherstellung reduzieren.

Zur Markierung des PCR-Produktes einer primären DOP-PCR mittels *Label*-PCR, wurde das Nukleotidgemisch mit einem fluoreszenzmarkierten dUTP versetzt. Die PCR-Bedingungen entsprachen denen der primären DOP-PCR. Die Hybridisierung resultierte in einem unspezifischen Hintergrund in Form von hellen Punkten auf dem Objektträger, welcher eine eindeutige Signalidentifizierung verhinderte. Ich veränderte das Protokoll deshalb so, dass die Spezifität der Reaktion im Sinne einer höheren Stringenz beeinflusst wurde: Die Annealingtemperatur wurde erhöht und die Primerkonzentration vermindert. Durch Erhöhung der Annealingtemperatur nahm die Zahl für die möglichen Hybridisierungsstellen der Primer stark ab und damit die Spezifität zu (Sambrook und Russell 2001). Die Reduktion der Primerkonzentration steigerte ebenfalls die Spezifität und verhinderte außerdem, dass sich Dimere der Oligonukleotide bildeten, welche amplifiziert werden könnten. Mit der so modifizierten *Label*-DOP-PCR erreichte ich Hybridisierungsergebnisse, deren Qualität (Signalintensität und Hintergrund) der Markierung mittels Nicktranslation entsprach. Die LIG-PCR wurde nach denselben Gesichtspunkten optimiert und konnte erfolgreich zur Markierung von DNA verwendet werden. Die Hybridisierung des PCR-Produktes resultierte allerdings in schwächeren Signalen als nach DOP-PCR. Darum wurde das *Coverage* der PCRs am Beispiel des BACs RP11-77f13 überprüft. Die Frage war, ob von dem etwa 200.000 bp großen BAC evtl. die Sequenz so ungünstig ist, dass nur ein kleiner Anteil der Sequenz amplifiziert wird, was die Signal-minderung erklären würde. Die Abdeckung der Sequenz mit Mse I-Schnittstellen war akzeptabel, die geringere Intensität der Signale war deshalb unverständlich. Möglicherweise bedarf es der Optimierung anderer Parameter.

Da die DOP-PCR bessere Ergebnisse zeigte und billiger und einfacher durchzuführen ist als die LIG-PCR, ist sie meiner Meinung nach für die Amplifizierung und Markierung von BAC-DNA zur Herstellung von FISH-Sonden der LIG-PCR vorzuziehen.

Folgende Vorteile sprechen insgesamt für den zukünftigen Einsatz der DOP-PCR in der klinischen Diagnostik:

1. Die PCR ist, wenn einmal etabliert, einfach durchzuführen und eine wenig anfällige Prozedur.

2. Es wird nur wenig Ausgangs-DNA benötigt, was aufwendige DNA-Präparationen einspart. Beispielsweise würde eine DNA-Präparation, wie sie für diese Arbeit verwendet wurde, etwa 500 μg DNA ergeben. Das würde für nur 500 bis 1000 Hybridisierungen nach Markierung mittels Nicktranslation reichen. Bei vorheriger Amplifizierung mittels PCR würde eine DNA-Präparation für 25.000 Nicktranslationen reichen. Wird nun noch statt mittels Nicktranslation mittels einer weiteren PCR markiert, reicht eine BAC-Präparation für 125.000 *Label*-PCRs und damit für über 1 Mio. Hybridisierungen (eine *Label*-PCR reicht für 10 Hybridisierungen).
3. Die Materialkosten für die Markierung einer Sonde betrugen mit Markierungs-DOP-PCR nur ca. € 0,80 und mit Nicktranslation ca. € 12,00 pro Hybridisierung.

Random Priming: Der Vorteil des *Random Primings* gegenüber der Nicktranslation besteht in der Verwendung nur eines Enzyms (Klenow-Fragment der Polymerase I) und somit der Umgehung des schwierigen Ballanceaktes der Konzentrationseinstellung zweier Enzyme bei der Nicktranslation.

Die Hybridisierung von mit dem *HexaLabel Plus DNA Labelling Kit* (*Fermentas*) markierter Sonde führte zu Signalintensitäten entsprechend der Nicktranslation. Allerdings war der Hintergrund so stark granuliert, dass eine eindeutige Signalidentifizierung verhindert wurde. Dies führte ich auf die zu große Fragmentlänge des Reaktionsprodukts (400 bis 4000 bp) zurück (vgl. 74). Darum wurde das Reaktionsprodukt mit DNase auf eine Länge von 400 bis 800 bp verdaut, wodurch der störende Hintergrund tatsächlich verschwand. Jedoch halbierte sich nun die Signalintensität. Dies liegt in der Methode begründet: Beim *Random Priming* wird der ursprüngliche DNA-Strang nicht verändert, sondern es werden davon ausgehend DNA-Stücke unter Einbau markierter Nukleotide synthetisiert, was in einer Verdopplung der DNA resultiert. Durch einen anschließenden Verdau wurde der ursprüngliche, unmarkierte Strang mitverdaut, so dass nun unmarkierte Fragmente um die Bindungsplätze konkurrierten. Um den DNase Verdau zu umgehen, versuchte ich die Fragmentlänge durch Erhöhung der Primerkonzentration einzustellen, da die Fragmentlänge der synthetisierten Stücke eine inverse Funktion der Primerkonzentration ist (Sambrook und Russell 2001). Dies führte zwar zu einer Verkürzung des Reaktionsproduktes, jedoch auch bei maximal möglicher Primerkonzentration im Reaktionsansatz wurde die gewünschte Fragmentlänge nicht erreicht. Auch die Durchführung von mehreren Zyklen aus Denaturierung und Reaktion, brachte keine ausreichende Verkürzung des Reaktionsprodukts, jedoch eine Nettosynthese von DNA ähnlich wie bei einer PCR-Reaktion.

In Anlehnung an ein Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Donna Albertson (*UCSF Comprehensive Cancer Center*, San Francisco, CA, USA) erhöhte ich die Enzym- und die Primernkonzentration. Dadurch kam es überraschenderweise zu einer deutlichen Amplifizierung von DNA. Die Länge des Reaktionsproduktes war zwar etwas kürzer (400 bis 3000 bp), der Hintergrund blieb jedoch weiterhin granuliert, so dass ein anschließender Verdau immer noch notwendig war. Wahrscheinlich kam es unter diesen günstigen Reaktionsbedingungen zu einer Verdrängung des synthetisierten Strangs durch das Enzym, wodurch sich immer neue Ansatzstellen für Primer ergeben. Dadurch wurde die Reaktion nicht am nächsten Primer gestoppt, sondern die Stücke wurden weiter synthetisiert. Evtl. ist dies auch der Grund dafür, dass auch nach maximaler Primerkonzentration nie eine wesentliche Verkürzung der Reaktionsprodukte eintrat. Der Versuch, bereits DNase I-verdaute DNA in die Reaktion einzusetzen, führte zu einem sehr schwachen Sonden-Signal. Der Grund dafür ist die ineffiziente Bindung der Hexanukleotidprimer an solch kurze DNA-Stücke (persönliche Mitteilung Dr. rer. nat. Andreas Rump).

Auf Grund der in der Methode begründeten Problematik des zu langen Reaktionsproduktes, erscheint mir das *Random Priming* für die Markierung von FISH-Sonden für die Interphase-FISH als nicht geeignet.

TdT-mediated dUTP-X nick end labeling (TUNEL): Wie beim *Random Priming* liegt auch bei der TUNEL-Reaktion der Vorteil in der Umgehung der Einstellung zweier Enzyme. Allerdings ist ein separater Verdau der DNA vor der Reaktion notwendig. Der Verdau mit Mse I gegenüber DNase I stellte sich unter Betrachtung aller Einzelexperimente als die zuverlässigere Variante heraus. Dies wird plausibel, wenn man bedenkt, dass die 3'-Enden der durch DNase I gesetzten Einzelstrangbrüche schwer zugänglich sind.

Mit dem *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* von Roche fand sich nach wiederholten Versuchen lediglich einmal ein sehr schwaches Signal. Das in diesem *Kit* verwendete Fluorochrom Fluorescein ergibt jedoch nach unseren Ergebnissen (siehe 5.1.1) nur eine schwache Signalintensität. Darum entwickelte ich ein eigenes Protokoll mit Verwendung von Biotin-dUTP zur indirekten Markierung, wobei verschiedene Nukleotidkombinationen und -konzentrationen in Anlehnung an die bisher verwendeten Methoden getestet wurden. Es machte keinen Unterschied, ob dTTPs oder dNTPs zusätzlich zu Biotin-dUTP verwendet wurden. Wurde der Anteil nichtmarkierter Moleküle erhöht, lief die Reaktion zwar effektiver ab, die Signalintensitäten waren jedoch gleich stark, da weniger markierte Nukleotide anteilig eingebaut wurden. Wurde jedoch nur Biotin-dUTP eingesetzt, ergab das ein deutlich schwächeres Signal, so dass die Reaktion hier

ineffektiv war. Außerdem kam es zu einem granulierten Hintergrund, was sich mit einer unspezifischen Bindung der Poli-dUTP-Sequenz erklären lässt.

Entscheidend war die Reaktionszeit. Je länger die Reaktionszeit, desto mehr Nukleotide können durch das Enzym angehängt werden (bis zu 50 bp laut der Firma *Fermentas*), und desto länger das Reaktionsprodukt und damit desto stärker das Signal. Dies bestätigte sich in meinen Experimenten: bei kurzer Reaktionszeit (30 min) war das Signal schwächer als bei Reaktionszeiten von 3 h, bei der eine Signalintensität entsprechend einer Nicktranslation erreicht wurde. Bei einer Reaktionszeit von 6 h kam es zu dem bei der Nicktranslation beschriebenen granulierten Hintergrund, der sich auf eine zu große Länge der erzeugten DNA-Fragmente zurückführen lässt (siehe 6.1.1).

In allen Experimenten fand sich ein deutlich größerer Hintergrund als nach einer Markierung mit Nicktranslation oder PCR, der auch durch die verschiedenen Variationen nicht beseitigt werden konnte. Da die vom Enzym synthetisierten Enden eine unspezifische Sequenz haben, wäre es theoretisch möglich, dass die entstandenen DNA-Stücke auch unspezifisch binden. Außerdem arbeitet das verwendete Enzym mit Kobaltionen, die den bevorzugten Einbau von Pyrimidinen bewirken (Sambrook und Russell 2001). Somit könnten Polypyrimidinstränge entstehen, welche sich ebenfalls unspezifisch an Polypurinsequenzen der Ziel-DNA binden.

Um das Protokoll zu verkürzen, versuchte ich den DNA-Verdau gleichzeitig mit der TUNEL-Reaktion durchzuführen. Dies erzeugte allerdings nur schwache Signalintensitäten und einen hohen Hintergrund.

Auf Grund des erhöhten Hintergrundes ist die Methode zum derzeitigen Entwicklungsstand der Nicktranslation und PCR unterlegen.

Chemische Markierung: Mit den beiden von mir getesteten *Kits* (*ARES DNA labeling Kit* und *ULYSIS Nucleic Acid labeling Kit*) war ein großer Teil der durchgeführten Experimente erfolglos. Mit dem *ULYSIS Nucleic Acid labeling Kit* erreichte ich in einzelnen Fällen ein sehr schwaches, kaum erkennbares Signal. Mit dem *ARES DNA labeling Kit* wurde in manchen Hybridisierungen zwar eine Signalintensität wie nach Nicktranslation erreicht, es fand sich jedoch immer ein sehr hoher Hintergrund auf dem Objektträger. Das Problem der chemischen Markierung ist die extrem hohe, unspezifische Reaktivität der Reagenzien, die eine besondere Reinheit der DNA erfordert (persönliche Mitteilung Dr. rer. nat. Michael Köhler). Mehrere zusätzliche Reinigungsschritte brachten jedoch keine Verbesserung.

Da die Fehlersuche hier nicht geleistet werden konnte, wurde die Firma *Kreatech* beauftragt, die Sonden-DNA chemisch zu markieren. Dies war jedoch erst erfolgreich, nachdem

auch die DNA nach firmeneigenem Protokoll isoliert wurde. Die Hybridisierungsergebnisse der von *Kreatech* markierten Sonden entsprachen in etwa denen der Nicktranslation, der Preis übersteigt jene jedoch bei weitem, so dass diese Möglichkeit für die Einführung eines diagnostischen Tests entfällt.

Die Markierung herkömmlicher DNA im Routinelabor mittels chemischer Markierung sollte nach weiteren technischen Verbesserungen erneut getestet werden.

Rolling Circle Amplification: Die Amplifizierung von BAC-DNA mittels des *TempliPhi DNA Sequencing Template Amplification Kits* (*Amersham Bioscience*) war erfolgreich. Das Produkt aus nur 100 pg BAC-DNA wurde mittels Nicktranslation markiert und brachte Ergebnisse entsprechend dem Einsatz von 200 bis 1000 ng DNA; ein zusätzlicher Reinigungsschritt vor Nicktranslation verbesserte deren Effektivität. Mein Ziel war es jedoch, das Prinzip der *Rolling Circle Amplification* zur gleichzeitigen Amplifizierung und Markierung von DNA zu nutzen. Wurde Biotin-dUTP zu dem Reaktionsansatz gegeben, führte dies zu einem schwachen Signal. Da die Zusammensetzung der Puffer des Kits nicht bekannt ist, und so das Verhältnis der Nukleotide nicht bestimmt werden konnte, entwickelte ich ein Protokoll in Anlehnung an die Publikationen von Lizardi et al. und Zhong et al. (Lizardi et al. 1998, Zhong et al. 2001) und unter Einbeziehung der Erfahrungen bezüglich der Nukleotidkonzentrationen bei anderen Methoden. Dadurch wurde eine Signalintensität entsprechend einer Nicktranslation erreicht, allerdings war der Hintergrund stärker. Um weitere Verbesserungen an dem Protokoll vornehmen zu können, sind jedoch mehr Informationen der Firma notwendig. Die Weiterentwicklung der Methode in Zusammenarbeit mit *Amersham Bioscience* ist vielversprechend, da das Protokoll einfach und ohne großen Arbeitsaufwand durchzuführen ist. Außerdem kann laut Firmenangaben DNA auch direkt aus Bakterien amplifiziert werden, was die aufwendige DNA-Präparation einsparen würde.

Meine Ergebnisse zeigten, dass die Nicktranslation sowie die Markierung und Amplifizierung mittels DOP-PCR sehr gut geeignet sind für die Herstellung von Interphase-FISH-Sonden. Auf Grund der einfacheren Durchführbarkeit und Kostenersparnis würde ich die DOP-PCR für einen diagnostischen Test vorziehen. Die chemische Markierung sowie die Markierung mit *Random Priming* ist auf Grund methodischer Probleme nicht für die Interphase-FISH-Diagnostik geeignet. Ich testete außerdem bisher für die Markierung von FISH-Sonden nicht verwendete, vielversprechende Methoden (*Rolling Circle Amplification*, *TUNEL*), welche jedoch noch einer weiteren Entwicklung bedürfen.

Interphase-FISH-Untersuchung von Paraffinmaterial

In Anlehnung an meine Ergebnisse (siehe 6.1.1) modifizierten ich die Parameter für die Hybridisierung an Paraffinmaterial wie folgt: Da hier durch das störende Gewebe und die Dicke der Schnitte der Hybridisierungsweg für die Sonden besonders lang ist, setzte ich einen Überschuss an DNA von $2\text{ }\mu\text{g}$ pro Sonde ein und erhöhte die Hybridisierungszeit auf 48 h. Die Einhaltung der DNA-Länge (300-600 bp) war aus eben genanntem Grund besonders wichtig. Ich verwendete jeweils einen Pool von zwei bis drei BAC-Klonen pro Sonde und markierte diesen mittels Nicktranslation mit dem für den jeweiligen Spektralbereich besten Fluorochrom (siehe 5.1.1, Tab. 5.3).

Mit den Filtern des Fluoreszenzmikroskops werden routinemäßig vier Spektralbereiche (blau, grün, rot, nahe Infrarot) unterschieden. Die Zahl der möglichen Sonden in einer Hybridisierung ist damit auf drei begrenzt (grün, rot, nahe Infrarot), da der blaue Spektralbereich für die Kerngegenfärbung (DAPI) gebraucht wird. Um die mögliche Anzahl der Sonden weiter erhöhen zu können, markierte ich die Sonden mit verschiedenen Farbstoffkombinationen, was ein Mischsignal erzeugte. Es stellte sich jedoch heraus, dass durch den erhöhten Hintergrund des Gewebes bei der Hybridisierung auf Paraffinmaterial keine eindeutige Zuordnung der Signale mehr möglich war (Ergebnis nicht gezeigt).

Für den enzymatischen Verdau des Gewebes stellte sich die Verwendung von Pepsin als optimal heraus: das Gewebe wurde weitgehend entfernt, ohne dass die Kerne angegriffen wurden. Dagegen griff Proteinase K frühzeitig die Kerne an, ohne das Gewebe ausreichend zu verdauen. Insgesamt war der bei Untersuchung von Paraffinschnitten notwendige Verdau des Gewebes sehr aufwendig und die Zeiten mussten für jeden individuellen Tumor neu ermittelt und ständig überprüft werden.

Ein besonderes Problem bei der Verwendung von Paraffinschnitten liegt darin, dass insbesondere die Erfassung von Deletionen durch Anschnittartefakte gestört ist (Baretton et al. 1998). Darum testete ich verschiedene Schnittdicken (6, 8, 10 und $12\text{ }\mu\text{m}$), um den besten Kompromiss aus akzeptablem Hintergrund und möglichst wenig angeschnitten Kernen zu erhalten. Bei einer Schnittdicke von $12\text{ }\mu\text{m}$ konnte das Gewebe nicht mehr ausreichend verdaut werden ohne die Kerne zu schädigen, was einen zu starken Hintergrund sowie eine schwache Signalintensität zur Folge hatte. Bei einer Schnittdicke von $6\text{ }\mu\text{m}$ waren ca. 40-66 % der Kerne angeschnitten – die Identifizierung eines DNA-Verlusts wäre hier schwer möglich –, während bei $10\text{ }\mu\text{m}$ dicken Schnitten nur 5-20 % angeschnittene Kerne gezählt wurden. Dies deckt sich mit den mathematisch ermittelten Erwartungswahrscheinlichkeiten (Baretton et al. 1998).

Ich entschied mich darum bei den Untersuchungen der 23 GBM und der drei Oligo-

dendroglione für eine Schnittdicke von 10 μm . Eine Region galt unter Berücksichtigung angeschnittener Kerne dann entsprechend als verloren, wenn der Verlust in mehr als 20 % der Kerne auftrat. Die Hybridisierungsergebnisse mit dem modifizierten Protokoll waren sehr gut. Alle Hybridisierungen waren eindeutig auswertbar. Lediglich in zwei Fällen war auf dem Paraffinblock nicht mehr genug Material für alle drei Sonden vorhanden. Die Interphase-FISH-Untersuchung stellt somit unter optimierten Bedingungen eine sehr zuverlässige Methode für die Untersuchung von Paraffinmaterial dar.

6.1.2 PCR-Amplifikation von DNA für die CGH-Analyse von paraffin-eingebettetem Tumorgewebe

Die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH), erstmals von Kallioniemi et al. beschrieben, ermöglicht die Aufklärung genetischer Imbalancen des gesamten Genoms in einem FISH-Experiment (Kallioniemi et al. 1992). Für ein klassisches CGH-Experiment werden ca. 0,2-2 μg DNA benötigt (Telenius et al. 1992). Stehen nur kleine DNA-Mengen (z. B. nach Mikrodissektion) zur Verfügung, muss eine gesamtgenomische, möglichst gleichmäßige DNA-Amplifizierung durchgeführt werden. Dafür steht zum einen die von Telenius et al. und Speicher et al. eingeführte DOP-PCR zur Verfügung (Telenius et al. 1992, Speicher et al. 1993), welche insbesondere auf Grund technischer Probleme mit DNA aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebetteten Material mehrfach modifiziert wurde (Kuukasjärvi et al. 1997, Huang et al. 2000). Kürzlich wurde außerdem die sogenannte ligationsbasierte (LIG)-PCR entwickelt und für CGH-Analysen angewandt (Klein et al. 1999, Stoecklein et al. 2002).

Zunächst testete ich anhand normaler DNA gesunder Probanden, ob die gewählten PCR-Methoden genomische DNA wirklich gleichmäßig amplifizieren können. Dazu wertete ich entsprechende CGH-Profile aus. Es zeigte sich, dass die mit DOP-PCR amplifizierte DNA falsch-positive chromosomale Verluste (Chromosom 17 und 19) sowie starke Verluste der Telomere und der subzentromerischen Regionen aufwies. Dies lässt sich durch eine bevorzugte Bindung GC-reicher Primer erklären, da deren Bindung nur zwei Wasserstoffbrücken erfordert. Dadurch kann das Annealing schneller erfolgen und GC-reiche Regionen würden stärker amplifiziert werden. Diese „Fehler“ ließen sich dadurch ausgleichen, dass auch die Kontroll-DNA mit DOP-PCR amplifiziert wurde, was ein glattes Profil, d. h. ohne Abweichungen von der Zentral-Linie, entsprechend einem normalen Karyotyp, ergab. Im Gegensatz zu meinen Ergebnissen berichteten Kuukasjärvi et al. 1997 über keine Abweichungen im Profil nach Hybridisierung mit DOP-PCR am-

plifizierter normaler DNA gegen nicht-amplifizierte Normal-DNA. Allerdings bestätigten meine Untersuchungen weitgehend die von Huang et al. 2000 beschriebenen Ergebnisse.

Die LIG-PCR umgeht das Problem der bevorzugten Primerbindung, indem zunächst DNA-Fragmente produziert werden, an deren Enden dann Primer ligiert werden. Tatsächlich fanden sich nach LIG-PCR bis auf eine leichte Tendenz zum Verlust einzelner Telomere keine falschen Aberrationen in der amplifizierten Normal-DNA und die Profile waren gleichmäßiger als nach DOP-PCR. Wurden beide DNAs mittels LIG-PCR amplifiziert, ergaben sich vollkommen glatte Profile. Klein et al. 1999 fanden ebenfalls keine Abweichungen von der Mittellinie wenn mittels LIG-PCR amplifizierte DNA einer einzelnen normalen Zelle mit normaler DNA hybridisiert wurde.

Bei Untersuchung von DNA einer Zelllinie, SKBR3, deren Aberrationen bekannt sind, bestätigten sich die an normaler DNA erhobenen Beobachtungen. Wurde nur die Tumor- und nicht die Kontroll-DNA mittels PCR amplifiziert, lieferte die DOP-PCR falsch positive Aberrationen und einige Veränderungen (insbesondere auf Chromosom 17 und 19) wurden nicht erkannt. Auch andere Autoren (Pirker et al. 2004, Tsubosa et al. 2005) berichten über falsch-positive CGH-Ergebnisse nach DOP-PCR von Zelllinien- bzw. Tumor-DNA. Dagegen fanden sich in der LIG-PCR keine falschen Aberrationen, und lediglich eine Aberration wurde nicht erkannt. Beide PCR-Methoden lieferten korrekte Profile, wenn auch die Kontroll-DNA mittels PCR amplifiziert wurde. Auch bei Einsatz von nur 1 ng SKBR3-DNA in eine LIG-PCR wurden noch alle Aberrationen nachgewiesen. Pirker et al. 2004 berichteten sogar über ein erfolgreiches CGH-Experiment nach LIG-PCR mit 5 pg Ausgangs-DNA aus Zellkultur, was in etwa der DNA-Menge einer diploiden Zelle entspricht.

Um die PCR-Methoden an DNA aus formalinfixiertem, paraffineingebetteten Material zu testen, verwendete ich Material eines GBM (ID 23). Hier zeigte sich, dass die LIG-PCR der DOP-PCR eindeutig überlegen war. Mit der DOP-PCR wurden die meisten Aberrationen nicht erkannt oder waren stark abgeschwächt. Dagegen fand sich nach LIG-PCR dasselbe CGH-Profil, wie nach Hybridisierung von nichtamplifizierter DNA. Wurde nur 1 ng Tumor-DNA in eine LIG-PCR eingesetzt, war die Hybridisierung immernoch auswertbar, und bis auf eine Aberration wurden alle Veränderungen erkannt. Meine Ergebnisse deckten sich somit mit einer Studie von Pirker et al., die ebenfalls bessere Ergebnisse mit der LIG-PCR gegenüber der DOP-PCR an DNA aus Paraffinmaterial erzielten, während sie an DNA aus Zellen und Frischmaterial beide Methoden erfolgreich einsetzten (Pirker et al. 2004).

Interessanterweise zeigte es sich, dass für die Markierung amplifizierter DNA aus Par-

affinmaterial (ID 23) die *Label*-PCR bessere geeignet war als die Nicktranslation, da einige Aberrationen in den Profilen deutlicher herauskamen, wohingegen es sich bei DNA aus Frischmaterial (SKBR3) genau andersherum verhielt. Diese Beobachtung stimmt mit der Studie von Huang et al. überein (Huang et al. 2000). Der Grund liegt meiner Meinung nach in der Länge der Ausgangs-DNA. Die optimale DNA-Länge für eine CGH-Hybridisierung ist 500-2000 bp (Kallioniemi et al. 1994). Da DNA aus Paraffinmaterial bereits degradiert ist, war die DNA nach PCR-Amplifizierung bereits so kurz (300-1000 bp), dass mittels Nicktranslation kein effizienter Einbau von Nukleotiden mehr erfolgen konnte, und durch die weitere Verkürzung der DNA die Hybridisierungsqualität zusätzlich verschlechtert wurde. Dagegen ist die Markierung mit *Label*-PCR auch kürzerer Fragmente effektiv und bringt keine zusätzliche Verkürzung der DNA. Im Gegensatz dazu war das PCR-Produkt nach Verwendung von Frischmaterial zu lang (>2000 bp), so dass hier erst durch Nicktranslation die optimale Länge erreicht wurde.

Insgesamt waren bei allen Experimenten die Profile nach *LIG*-PCR gleichmäßiger als nach *DOP*-PCR, was ich auf eine gleichmäßigere Amplifizierung der DNA und eine bessere Widerspiegelung des Gesamt-Genoms zurückführe.

Ich wendete die *LIG*-PCR mit *Label*-PCR für die CGH-Untersuchung an mikrodiseziertem, formalinfixiertem und paraffineingebetteten Material von 13 GBMO an. Die besonderen Schwierigkeiten lagen hier neben der Degradierung und niedrigen Konzentration der DNA auch in einer Kontaminierung mit Substanzen wie z. B. Formalin, welche die PCR-Reaktion inhibieren können (Cao et al. 2003). Dementsprechend niedrig sind die Erfolgsraten von PCR-Amplifizierungen an Paraffinmaterial im Allgemeinen (60-70 %) (Coura et al. 2005), sowie für CGH-Experimente (40-50 % bzw. 17-87 %) (Kuukasjärvi et al. 1997, Pirker et al. 2004) in der Literatur. Von den 13 GBMO waren in 10 Tumoren beide Anteile und in drei Tumoren lediglich noch ein Anteil auf dem Paraffinblock vorhanden, so dass ich insgesamt 23 DNA-Proben untersuchte. Davon waren 22 CGH-Experimente erfolgreich (96 %), womit meine Erfolgsrate deutlich über der in der Literatur beschriebenen Raten lag.

Insgesamt sprechen meine Ergebnisse, in Übereinstimmung mit anderen Studien (Klein et al. 1999, Stoecklein et al. 2002, Pirker et al. 2004), für die Verwendung der *LIG*-statt der *DOP*-PCR zur Amplifizierung schwieriger und limitierter DNA für CGH-Untersuchungen.

6.1.3 Vergleich von Ergebnissen der Interphase-FISH- und CGH-

Untersuchungen

Insgesamt stimmten die Interphase-FISH-Ergebnisse gut mit den CGH-Ergebnissen überein. Es gab jedoch auch Abweichungen, welche in den Methoden begründet liegen. Dies betraf v. a. heterochromatinreiche Regionen wie 1p32-pter (ID 3,10,11) und Chromosom 19 (ID 1,5,8,12). In CGH-Untersuchungen sind diese Regionen bekanntermaßen kritisch (Kallioniemi et al. 1994), entscheidend waren darum die Ergebnisse der Interphase-FISH-Analyse. Veränderungen die sich nur in einem geringen Teil der Zellen (20 bis 30 %) fanden (ID 3,5,11: -17p, ID 11: +21), können mit der Interphase-FISH-Untersuchung erkannt werden (Smith et al. 2000a) und mussten der CGH-Analyse entgehen, welche nur Imbalancen aufdeckt, die in mindestens 40 % der Zellen vorliegt (du Manoir et al. 1995). Ein weiterer Unterschied ist das Auflösungsvermögen der beiden Methoden: Veränderungen die kleiner sind als 2 MB entgehen der CGH-Analyse (Jeuken et al. 2001). Dies könnte z. B. bei dem Gewinn von Chromosom 10 bei Tumor mit ID 3 sowie beim Gewinn von 17p bei Tumor 10 der Fall sein, die sich jeweils nur in der Interphase-FISH-Untersuchung fanden. Bei drei Tumoren fand sich eine Veränderung in der Interphase-FISH-Analyse, die in der CGH-Untersuchung nur in angrenzenden Regionen gefunden wurde (ID 2: Interphase-FISH +21q11.2, CGH: amp21q21; ID 9: Interphase-FISH -10q23.3, CGH: -10q25-qter, ID 10: Interphase-FISH: +17p13, CGH: +17q), wobei auch hier die geringe Auflösung der CGH am ehesten der Grund für die Unterschiede ist.

In meiner Auswertung der Interphase-FISH-Untersuchung (siehe Abb. 5.5) zeigte sich, dass die GBMO meist aus unterschiedlichen Zellklonen bestehen, und außerdem auch immer ein Anteil an normalen Zellen, z. B. bedingt durch das infiltrative Wachstum von Gliomen sowie durch eingestreute Mikrogliazellen, im Tumorgewebe vorhanden ist. Dieser Anteil an normalen Zellen kann nach meinen Ergebnissen sogar größer sein als der häufigste Tumorzellklon (siehe Abb. 5.5), wodurch es möglich ist, dass bestimmte Veränderungen der CGH-Analyse oder anderen molekulargenetischen Methoden entgehen, bei denen DNA aus Tumorgewebe gewonnen wird, und somit ein Zellgemisch untersucht wird. Dies muss beachtet werden, wenn man die Ergebnisse solcher Untersuchungen aus der Literatur bzw. meine CGH-Ergebnisse mit meinen Interphase-FISH-Ergebnissen vergleicht.

6.2 Untersuchung der Gliome

Das Glioblastom ist der häufigste und zugleich bösartigste Hirntumor und hat nach wie vor eine sehr ungünstige Prognose. Es wird in die Gruppe der astrozytären Gliome eingeordnet. Allerdings finden sich in einigen Glioblastomen auch Areale mit oligodendroglia-ähnlichem Erscheinungsbild (Decaestecker et al. 1998, Bigner et al. 1999). Oligodendrogliome, welche ca. 5-20 % der Gliome ausmachen, zeigen im Vergleich zu astrozytären Gliomen häufig den kombinierten Verlust von 1p und 19q und haben eine günstigere Prognose (Cairncross et al. 1998, Smith et al. 2000a).

Das Ziel dieser Arbeit war es, *Glioblastome mit einer oligodendroglialen Komponente* (GBMO) genetisch zu charakterisieren sowie einen möglichen Einfluss histologischer und genetischer Parameter auf die Prognose von Glioblastompatienten zu untersuchen. Bis heute ist diese Entität nicht als eigenständige Diagnose in die WHO-Klassifikation aufgenommen (Kleihues et al. 2002). Eindeutige diagnostische Kriterien fehlen. Dementsprechend gibt es wenige genetische Untersuchungen an GBMO in der Literatur (Bigner et al. 1999, He et al. 2001, Kraus et al. 2001a, Fuller et al. 2003, Walker et al. 2003). Sie werden dort unter anderem als Glioblastome mit oligodendroglialer Komponente oder Oligoastrozytome Grad IV bezeichnet. Ich stellte eine Serie von 13 solcher Tumoren aus dem Archiv des Institutes für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena zusammen. Die relativ kleine Fallzahl ist durch die Seltenheit dieser Tumoren bedingt [nur etwa 3,5-17 % aller GBM (Decaestecker et al. 1998, He et al. 2001, Hilton et al. 2004)] und entspricht dem Umfang vorangegangener Untersuchungen. Die bisher größte Studie an GBMO wurde von He et al. publiziert und umfasste 25 Tumoren (He et al. 2001). Kraus et al. analysierten wie ich eine Gruppe von 13 GBMO (Kraus et al. 2001a). Weitere Veröffentlichungen hatten kleinere Fallzahlen (Bigner et al. 1999, Walker et al. 2003). Um die GBMO von anaplastischen Oligoastrozytomen abzugrenzen, schloss ich nur solche Tumoren ein, die auch klassische Glioblastomanteile aufwiesen.

Außerdem wählte ich 10 klassische Glioblastome ohne histologische Besonderheiten sowie drei Oligodendrogliome als Kontrollgruppen zufällig aus dem Archiv für Pathologie in Jena aus.

6.2.1 Einfluss einer oligodendroglialen Komponente auf die Prognose

Ich unterschied Tumoren mit Anteilen mit typischer Honigwabenstruktur und GFAP-Negativität (GBMO-H) von Tumoren mit Anteilen bestehend aus rundlichen, gleichförmigen, GFAP-negativen Tumorzellen (GBMO-R). Diese Abgrenzung ist nicht ganz

unproblematisch. Sie ist so in der Literatur nicht zu finden. Ob es sich bei den rundlichen Zellen der GBMO-R wirklich um eine oligodendrogliale Differenzierung handelt, ist unklar. Ich habe diese Anteile jedoch trotzdem als besonders betrachtet, da (1) sie sich von den klassischen astrozytären Glioblastom-Anteilen unterscheiden, (2) sie unabhängig von ihrer Herkunft einen prognostischen Marker darstellen können, (3) sie morphologische Ähnlichkeit mit oligodendroglialen Zellen besitzen, die ebenfalls rundlich, gleichförmig und GFAP-negativ sind und (4) bisher keine eindeutigen prognostischen Kriterien für GBMO vorliegen.

Beim Vergleich der Überlebenszeiten der 13 GBMO-Patienten mit einer zufällig ausgewählten, unabhängigen Vergleichsgruppe von 10 GBM-Patienten, zeigte es sich, dass die durchschnittliche Überlebenszeit von Patienten mit einem GBMO deutlich länger war (404 vs. 282 Tage). In den multivariaten Analysen, welche Alter, Geschlecht, Therapie und genetische Veränderungen einbezogen, stellte der Nachweis einer oligodendroglialen Komponente einen unabhängigen und signifikanten günstigen prognostischen Faktor dar ($p = 0,005$). Interessanterweise traf dies sowohl für die GBMO mit klassischen Honigwabenzellen (GBMO-H), als auch mit gleichförmig rundlichen, GFAP-negativen Zellen (GBMO-R) zu. Dies bestätigte die Ergebnisse anderer Studien (Hilton et al. 2004, Pinto und Chimelli 2004). In einer aktuellen Studie von Homma et al. war allerdings ein günstiger prognostischer Einfluss einer oligodendroglialen Komponente in Glioblastomen nur in univariaten und nicht in multivariaten Analysen nachweisbar (Homma et al. 2006).

Insgesamt sprechen meine sowie die eben genannten Ergebnisse dafür, die Diagnose „Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente“ als eigenständige Gruppe in die nächste WHO-Klassifikation der Hirntumoren aufzunehmen. Meine Ergebnisse zeigten außerdem erstmals, dass auch Glioblastome mit Arealen bestehend aus Tumorzellen mit gleichförmig rundlichen Kernen und GFAP-Negativität (GBMO-R), jedoch ohne Honigwaben, eine günstigere Prognose haben. Somit sollte in der Diagnostik der GBMO als histologische Kriterien auf GFAP-negative Areale sowohl mit Honigwabenzellen als auch mit gleichförmig rundlichen Zellen geachtet werden, insbesondere, da das Auftreten von Honigwabenzellen lediglich ein Schrumpfungsartefakt des Zytoplasmas darstellt, welches durch die Formalinfixierung des Gewebes entsteht (Paulus 2002). Die prädiktive Bedeutung dieses Markers sollte in weiteren prospektiven und insbesondere bei dieser seltenen Tumorgruppe möglichst multizentrischen Studien evaluiert werden.

6.2.2 Einfluss klinischer Parameter auf die Prognose

Strahlentherapie: Walker et al. zeigten erstmals in einer prospektiven Studie, die bis heute Gültigkeit besitzt, dass Patienten mit Glioblastomen signifikant länger überlebten, wenn sie eine zusätzliche postoperative Bestrahlung erhalten (Walker et al. 1978). Dies wurde seitdem in zahlreichen Studien bestätigt (Salazar et al. 1979, de Crevoisier et al. 1997, Fiveash und Spencer 2003, Keime-Guibert et al. 2007, Mineo et al. 2007). In den von mir untersuchten 23 Glioblastompatienten war eine postoperative Bestrahlung der am meisten signifikante prognostische Faktor in multivariaten Analysen (373 vs. 102 Tage, $p = 0,001$).

Chemotherapie: Die Chemotherapie erlebt in der Therapie der Glioblastome seit der EORTC 26981/22981-NCIC CE3 Phase III Studie eine Renaissance. Während frühere Studien keine eindeutige Überlebenszeitverbesserung durch eine zusätzliche Therapie mit herkömmlichen Chemotherapeutika nachwiesen (Shapiro et al. 1989, Hildebrand et al. 1994, MedicalResearchCouncil 2001), zeigte diese Studie den positiven Effekt einer zusätzlichen und adjuvanten Chemotherapie mit Temozolomid auf das Überleben von Glioblastompatienten, allerdings betrug der Zeitraum nur 2 Monate (Stupp et al. 2005). Die von mir untersuchten Patienten wurden zwischen 1997 und 2002 mit unterschiedlichen Therapieregimen behandelt. Vier Patienten erhielten eine zusätzliche Chemotherapie mit Temozolomid, zwei mit ACNU, ein Patient mit PCV und zwei Patienten eine zusätzliche Chemotherapie mit mir nicht bekannten Medikamenten. Die übrigen 14 Patienten erhielten keine Chemotherapie. Ich fand in dieser kleinen weder in univariaten noch in multivariaten Analysen einen Einfluss einer zusätzlichen Chemotherapie im Allgemeinen oder einer Chemotherapie mit Temozolomid auf die Überlebenszeit in den 23 Glioblastompatienten. Insbesondere ergab sich kein Einfluss in der Gruppe der Patienten mit einem GBMO, obwohl Oligodendrogliome bekanntermaßen gut auf Chemotherapie ansprechen (Reifenberger und Louis 2003, Stege et al. 2005).

Alter: Zahlreiche Studien zeigten, dass ein jüngeres Alter zum Diagnosezeitpunkt ein wichtiger günstiger prognostischer Parameter bei Glioblastompatienten ist (Burger und Green 1987, Hofer et al. 1999, Tortosa et al. 2003, Ohgaki et al. 2004). Auch in den von mir untersuchten 23 Patienten mit einem Glioblastom überlebten Patienten mit einem Alter unter 60 Jahren signifikant länger als Patienten älter als 60 Jahre; dies zeigte die Kaplan-Meier-Analyse ($p = 0,047$). In multivariaten Analysen, welche Therapie, Geschlecht, Histologie und Genetik einschlossen, wurde das jedoch nicht bestätigt ($p = 0,93$). Allerdings ist meine Fallzahl relativ klein, so dass der Einfluss anderer Faktoren in der multivariaten Analyse möglicherweise überwog. Patienten mit einem GBMO

waren durchschnittlich etwas jünger als Patienten mit einem GBM, so dass zumindest ein Einfluss des Alters auf die günstigere Überlebenszeit der Patienten mit einem GBMO diskutiert werden muss. Umgekehrt könnte man jedoch auch spekulieren, dass das günstigere Überleben jüngerer Patienten mit Glioblastomen mit bedingt ist durch histologische (und/oder genetische) Besonderheiten in Tumoren dieser Altersgruppe.

6.2.3 Genetische Charakterisierung der Gliome und Einfluss auf die Prognose

Um die GBMO genetisch charakterisieren zu können, untersuchte ich den oligodendroglialen Anteil und den astrozytären, „klassischen“ Glioblastomanteil getrennt, was nach meinem Wissen bisher noch nicht publiziert wurde. Ich wählte als Untersuchungsmethoden zum einen die Interphase-FISH-Technik an Paraffinschnitten aus, wodurch ich die Ergebnisse in Bezug auf die Morphologie auswerten konnte. Dazu entwickelte ich ein eigenes Sondenset bestehend aus „oligodendroglialen“ und „astrozytären“ Markern. Als „oligodendrogliale“ Marker wählte ich zwei Regionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 und eine Region auf dem langen Arm von Chromosom 19 (siehe 4.2), deren kombinierter Verlust die häufigste Veränderung in Oligodendrogliomen darstellt (Reifenberger und Louis 2003) und ein etablierter prognostischer Marker in diesen Tumoren ist (Cairncross et al. 2006, van den Bent et al. 2006). Der Gewinn des langen Arms von Chromosom 7 und der Verlust des langen Arms von Chromosom 10 sind die am häufigsten gefundenen Veränderungen in GBM (Bigner und Schröck 1997, Koschny et al. 2002) und dienen mit dem Tumorsuppressorgen *TP53* auf 17p, welches typischerweise in Astrozytomen und sekundären GBM mutiert oder verloren ist (Collins 1999, Schmidt et al. 2002), als „astrozytäre“ Marker.

Um außerdem einen Überblick über die genetischen Veränderungen in den GBMO zu erhalten, wurden die beiden histologisch unterschiedlichen Anteile mikrodissiziert und nach Amplifizierung der DNA mittels LIG-PCR mit der CGH-Untersuchung analysiert.

Einteilung der Glioblastome mit oligodendroglialen Komponente in genetische Gruppen

Die Ergebnisse der Interphase-FISH-Analysen zeigten, dass die 13 von mir untersuchten GBMO genetisch heterogen waren und sich aus vier genetischen Gruppen zusammensetzten: Neun der 13 GBMO wiesen den Gewinn des langen Arms von Chromosom 7 und Verlust des langen Arms von Chromosom 10 auf und wurden genetisch in die „astro-

zytäre“ Gruppe eingeordnet. Ein GBMO (ID 6) mit typisch oligodendroglialen Veränderungen – Verlust von 1p und 19q – wurde der „oligodendroglialen“ Gruppe zugeordnet. Ein GBMO (ID 1) zeigte eine Kombination der Veränderungen beider Gruppen, nämlich den Gewinn des langen Arms von Chromosom 7 und den Verlust eines Teils des kurzen Arms von Chromosom 1 und wurde deshalb als „intermediär“ eingestuft. Zwei GBMO (ID 3,11) zeigten keine dieser für oligodendrogliale oder astrozytäre Tumoren typischen Veränderungen und wurden darum in eine 4. Gruppe – „andere“ – zusammengefasst.

Jeuken et al. untersuchten Oligoastrozytome mittels CGH, die sie in „*low-grade*“ und „*high-grade*“ Tumoren unterteilten (Jeuken et al. 2001). Sie beschrieben in diesen Tumoren erstmals die vier auch von mir gefundenen genetischen Gruppen. Zwölf der „*high-grade*“ Oligoastrozytome wären bei strenger Klassifikation als GBM reklassifiziert worden, und könnten nach meiner Auffassung GBMO darstellen. Neun dieser „GBMO“ entsprachen, ähnlich meiner Ergebnisse, der „astrozytären“ Gruppe, zwei der „intermediären“ Gruppe und einer der Gruppe „andere“. Keiner dieser Tumoren wies einen kombinierten Verlust von 1p/19q auf. Bigner et al. untersuchten vier GBMO mittels CGH, und fanden in einem GBMO den kombinierten Verlust von 1p/19q und in drei GBMO Gewinn von Chromosom 7 und Verlust von Chromosom 10 (Bigner et al. 1999). Allerdings war das GBMO mit 1p/19q-Verlust nach meinen Kriterien eigentlich ein anaplastisches Oligodendrogliom (WHO-Grad III), da eine eindeutige astrozytäre Glioblastomkomponente fehlte.

In der Kontrollgruppe entsprachen alle drei von mir untersuchten Oligodendrogliome genetisch der „oligodendroglialen“ und alle zehn „klassischen“ GBM der „astrozytären“ Gruppe und ließen sich mit der Interphase-FISH-Technik mit dem von mir entwickelten SONDENSET eindeutig voneinander unterscheiden. Im Gegensatz zu meinen Untersuchungen sind Oligodendrogliome und Glioblastome in der Literatur jedoch nicht genetisch homogen (vgl. 5.2.2, Abb. 5.3), denn es finden sich jeweils auch Tumoren mit astrozytären Veränderungen in Oligodendrogliomen (Jeuken et al. 1999, Hoang-Xuan et al. 2001) bzw. Tumoren ohne Gewinn von Chromosom 7 und Verlust von Chromosom 10 in Glioblastomen (Nakamura et al. 2000, Misra et al. 2005), wenn auch jeweils nur in einem kleineren Anteil. Meine Ergebnisse sind sicherlich auf Grund der kleinen Fallzahlen mit Vorsicht zu betrachten. Jedoch hat die Interphase-FISH-Untersuchung als Einzelzellanalyse eine viel größere Sensitivität als Methoden, wie z. B. die LOH-Analyse, die vielen der hier zitierten Studien zu Grunde liegt (Perry et al. 1997). So fand sich mittels LOH-Analyse nur in zwei der drei Oligodendrogliome meiner Kontrollgruppe ein Verlust von 1p/19q (Ergebnisse nicht gezeigt). Zudem wurden die Tumoren in dieser

Studie nach strengen histologischen Kriterien reklassifiziert: nur klassische Tumoren ohne histologische Besonderheiten wurden in die Gruppe der 10 "klassischen"GBM bzw. der drei Oligodendrogliome eingeschlossen. Die genetische Heterogenität in der Literatur ist meiner Meinung nach zumindest zum Teil durch eine ungenaue histologische Klassifikation bedingt. Diese Auffassung wird von Studien unterstützt die zeigten, dass eine Anwendung strikter Klassifikationskriterien den Anteil von Gliomen mit abweichendem genetischen Profil deutlich verringert (Jeuken et al. 2001, Sasaki et al. 2002).

Meine Ergebnisse belegen somit, dass molekular-zytogenetische Analysen eine wichtige diagnostische Ergänzung zur Klassifikation der Gliome darstellen, insbesondere, wenn es sich um Tumoren handelt, in denen die zumeist subjektiven histologischen Kriterien für eine eindeutige Unterscheidung zwischen Oligodendrogliomen, Astrozytomen und Mischgliomen nicht ausreichen. Die Interphase-FISH-Diagnostik mit den spezifischen SONDENSSETS stellt durch ihre Sensitivität sowie einfache Durchführbarkeit hierfür eine anwendungsbereite Methode dar.

Einfluss der Einteilung in genetische Gruppen auf das Überleben: Die vier genetischen Subgruppen unterschieden sich signifikant im Überleben ($p = 0,022$), und zwar überlebten die zwei Patienten mit Tumoren der Gruppe „andere“ am längsten (451 Tage), während Patienten mit Tumoren der „oligodendroglialen“ und „astrozytären“ Gruppe etwa gleich lang (365 und 357 Tage) und der Patient mit dem „intermediären“ Tumor nur 102 Tage überlebte. Die Tumoren der Gruppe „andere“ zeigten genetische Veränderungen, die untypisch für gliale Tumoren sind. Meine Ergebnisse lassen vermuten, dass es eine Gruppe von Glioblastomen mit einem bisher nicht bekannten genetischen Entstehungsweg gibt, welche möglicherweise mit einer günstigen Prognose verbunden sind. Diese Tumoren können durch Anwendung des SONDENSSETS von den Tumoren mit typischen glialen (astrozytären, oligodendroglialen und intermediären) Veränderungen unterschieden werden. Ein Gewinn auf dem langen Arm von Chromosom 10 (10q23) sowie der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 16 wurden ausschließlich in diesen Tumoren gefunden. Beide Tumoren hatten einen Gewinn des kurzen Arms von Chromosom 9, was selten in GBM ist. Interessanterweise beschrieben Korshunov et al. in 40 von 189 untersuchten GBM (22 %) von Patienten unter 50 Jahren einen Gewinn von 9p und fanden erstmals einen signifikanten, unabhängigen positiven prognostischen Einfluss dieser Veränderung auf das Überleben (Korshunov et al. 2004).

Genetische Veränderungen in GBMO und GBM

Verlust von 1p/19q: In den letzten Jahren wurde besondere Aufmerksamkeit auf den kombinierten Verlust von 1p und 19q in Gliomen gerichtet. Während diese Veränderung in der Mehrzahl der Oligodendrogliome gefunden wurde (Reifenberger und Louis 2003) und dort mit einem besseren Überleben und einem guten Ansprechen auf Chemo- und Strahlentherapie verbunden ist (Cairncross et al. 2006, van den Bent et al. 2006), ist ihre prognostische Bedeutung in Glioblastomen bisher unklar (Ino et al. 2001, Schmidt et al. 2002, Brat et al. 2004, Houillier et al. 2006). Die Inzidenz von 1p/19q-Deletionen in Glioblastomen ist niedrig (von Deimling et al. 2000). Ich fand den Verlust von 1p/19q in einem von 13 GBMO (ID 6) und in keinem der 10 klassischen GBM. Kraus et al. untersuchten ebenso 13 GBMO mittels LOH-Analyse und fanden auch in einem Fall den Verlust von 1p und 19q (Kraus et al. 2001a). He et al. stellten in sieben von 25 GBMO (27 %) mittels LOH-Analyse einen kombinierten Verlust von 1p und 19q fest (He et al. 2001). Insgesamt ist also der Nachweis einer oligodendroglialen Komponente in Glioblastomen mit einem häufigeren Auftreten von 1p/19q-Deletionen im Vergleich zu klassischen Glioblastomen verbunden.

Ein Verlust von 1p/19q hat wahrscheinlich keinen Einfluss auf das Überleben in der Gruppe der 23 GBM-Patienten bzw. der 13 Patienten mit einem GBMO. Es handelte sich zwar nur um einen Tumor (ID 6), allerdings deckte sich der Befund mit den Ergebnissen aus der Literatur bei Glioblastomen (Smith et al. 2000a, Houillier et al. 2006), Oligoastrozytomen (Smith et al. 2000a, Fuller et al. 2003, Okamoto et al. 2004) und diffusen Astrozytomen (WHO-Grad II) (Okamoto et al. 2004). Lediglich Schmidt et al. fanden eine längere Überlebenszeit in 5 von 73 Patienten mit einem Glioblastom und kombiniertem Verlust von 1p und 19q (Schmidt et al. 2002). Der alleinige Verlust von 1p oder 19q hatte dabei jedoch keinen Einfluss. Das stimmt auch mit meinem Ergebnis überein: der Patient mit dem alleinigen Verlust von 1p (ID 1, „intermediäre“ Gruppe) zeigte kein verlängertes Überleben, sondern sogar die kürzeste Überlebenszeit.

Der Tumor mit Nachweis eines Verlusts von 1p/19q (ID 6) bestand histologisch v. a. aus einem oligodendroglialen Anteil mit kleinherdigem Übergang in ein GBM. Der Verlust von 1p/19q hätte nach heutigem Wissensstand für die Diagnose Oligodendrogliom gesprochen. Der ungünstige klinische Verlauf mit einer Überlebenszeit von nur einem Jahr bestätigte jedoch, dass es sich um ein GBM handelte und die Diagnose Oligodendrogliom hier aus klinischer Sicht nicht angemessen gewesen wäre. Interessanterweise lagen in diesem Tumor zusätzliche genetische Veränderungen – und zwar nur in dem astrozytären Anteil – vor, die bekanntermaßen mit der Progression in Gliomen assozi-

iert sind und häufig in GBM gefunden werden: -4q, -6q -9p, -13q, -18 (Schröck et al. 1994, Kleihues et al. 1995, Weber et al. 1996, Bigner et al. 1999, Wooten et al. 1999, Nakamura et al. 2000, Fallon et al. 2004). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Bestimmung des 1p/19q-Status in Gliomen nicht ausreicht, um eine genauere Aussage über die Diagnose und somit Prognose machen zu können. Zusätzliche Marker haben innerhalb der genetischen Gruppen eine Bedeutung und müssen mit untersucht werden. Z. B. könnte der Verlust von 9p in diesen Tumoren ein ungünstiger prognostischer Marker sein, wohingegen er in den GBM insgesamt keinen Einfluss auf die Prognose hatte (siehe S. 95). Für zukünftige Studien heißt das meiner Meinung nach, dass die Bedeutung einer Mehrzahl gentischer Veränderungen nicht nur im Hinblick auf die histologischen, sondern auch die genetischen Gruppen untersucht werden muss, da die genetische Heterogenität prognostische Effekte verschleiern könnte.

Verlust von Chromosom 19: Der alleinige Verlust von Chromosom 19 ist im Gegensatz zu 1p/19q-Deletionen eine häufige Veränderung in Glioblastomen und gilt als Progressionsmarker in Astrozytomen (von Deimling et al. 1994a, Ohgaki et al. 1995, Smith et al. 2000a). In unterschiedlichen Studien wurde er häufiger in sekundären (54 vs. 6 %) (Nakamura et al. 2000), oder primären (0 vs. 30 %) (von Deimling et al. 2000) GBM gefunden. Ich fand einen alleinigen Verlust von 19q in drei von 12 GBMO (25 %), und zwar nur in Tumoren der Patienten mit Langzeitüberleben ($p = 0,045$). Dagegen war der Verlust des gesamten Chromosoms 19 ebenso in drei GBMO (25 %) mit einem signifikant schlechteren Überleben im Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven verbunden ($p = 0,005$). In der Literatur finden sich dazu unterschiedliche Ergebnisse. Einige Autoren fanden keinen Einfluss eines Verlusts auf 19q in Bezug auf die Überlebenszeit (Schmidt et al. 2002, Houillier et al. 2006), allerdings differenzieren diese Studien nicht zwischen kurzem und langem Arm, da 19p nicht untersucht wurde. Burton et al. fanden in CGH-Untersuchungen an 39 GBM übereinstimmend mit meinen Ergebnissen den isolierten Verlust nur des langen Arms von Chromosom 19 ausschließlich in Glioblastompatienten mit Langzeitüberleben (Burton et al. 2002a). Auch Brat et al. 2004 fanden mittels FISH einen alleinigen 19q-Verlust signifikant häufiger in „Langzeitüberlebenden“. Meiner Meinung nach sind diese Ergebnisse ein Hinweis darauf, dass hier zwei verschiedene genetische Marker vorliegen, einmal der Verlust nur des langen Arms von Chromosom 19 und einmal der Verlust des gesamten Chromosoms. Somit sind zusätzliche Tumorsuppressorgene auf dem kurzen Arm von Chromosom 19 zu vermuten.

Gewinn von Chromosom 19: In den von mir untersuchten zehn „klassischen“ GBM war der Gewinn des langen Arms von Chromosom 19 mit einem signifikant schlechteren

Überleben verbunden ($p = 0,002$). Bis auf Burton et al., welche einen Gewinn von Chromosom 19 ebenfalls mit einer kürzeren Überlebenszeit in Glioblastomen in Verbindung brachten (Burton et al. 2002a), gibt es bisher keine Aussagen dazu in der Literatur. Im Gegensatz zu den klassischen Glioblastomen, hatte der Gewinn von 19q in der Gruppe der GBMO keinen Einfluss auf die Prognose. Interessanterweise kam diese Veränderung jedoch ausschließlich in Tumoren der „astrozytären“ Gruppe vor, was ein Grund für die Unterschiede zwischen den klassischen GBM und den GBMO sein könnte. Möglicherweise stellt der Gewinn von 19q somit einen ungünstigen prognostischen Marker in klassischen GBM mit +7/-10 dar. Insgesamt ist Chromosom 19p/q somit ein interessanter und wichtiger Kandidat für einen prognostischen Marker, da sein Gewinn mit schlechterem, sein Verlust mit besser Prognose verbunden zu sein scheint.

Gewinn von Chromosom 7 und Verlust von Chromosom 10: Der Gewinn von Chromosom 7 und der Verlust von Chromosom 10 fand sich in neun von 13 GBMO (69 %) und in allen zehn klassischen GBM (100 %) und trat immer in Kombination auf. Es sind die häufigsten Veränderungen, die in Glioblastomen gefunden werden, je nach Untersuchungsmethode in etwa 40 bis über 90 % der Fälle (Bigner und Schröck 1997, Smith und Jenkins 2000, Koschny et al. 2002, Behin et al. 2003). He et al. fanden den Verlust von 10q in sieben von 25 GBMO (64 %) (He et al. 2001), was gut mit meinen Ergebnissen übereinstimmt.

Beide Veränderungen hatten in den von mir untersuchten 13 GBMO keinen Einfluss auf die Länge der Überlebenszeit. In bisherigen Studien, welche anaplastische Astrozytome (AA) und GBM einschlossen, war LOH von Chromosom 10q ein unabhängiger ungünstiger prognostischer Faktor (Ganju et al. 1994, Leenstra et al. 1994, Balesaria et al. 1999, Schmidt et al. 2002, Homma et al. 2006), allerdings beruhte dies überwiegend auf den AA, die dann eher als GBM zu bewerten sind. Neuere Studien, die nur Glioblastome einschlossen, wiesen teilweise keinen Einfluss von Verlusten auf Chromosom 10 auf die Überlebenszeit nach (von Deimling et al. 2000, Houillier et al. 2006). Jedoch fanden Arslantas et al. sowie Lopez-Gines et al. in 20 bzw. 25 mittels CGH- bzw. FISH-Analyse untersuchten GBM, dass der Gewinn von Chromosom 7 und der Verlust von Chromosom 10 jeweils mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert waren (Arslantas et al. 2004, Lopez-Gines et al. 2005). Da GBM-Patienten insgesamt eine sehr kurze Überlebenszeit zeigen, sind Unterschiede in der Überlebenszeit schwer zu finden. Die Bewertung der hier dargestellten Ergebnisse ergibt meiner Meinung nach, dass der kombinierte Verlust von Chromosom 10 und Gewinn von Chromosom 7 ein geeigneter diagnostischer Marker für GBM und GBMO ist, und als schlechter prognostischer Faktor

vor allem in AA zu werten ist.

Verlust von 17p: Ich fand einen Verlust von 17p (*TP53*) in der Interphase-FISH-Untersuchung in fünf von 13 GBMO (38 %) und drei von 10 GBM (30 %), was gut mit bisherigen Untersuchungen übereinstimmte (Lang et al. 1994, Jones et al. 1995). Davon zeigten drei GBMO und ein GBM diese Veränderung nur in 20-30 % der Zellen, die somit mittels CGH-Analyse nicht nachweisbar war. Die betroffenen Patienten zeigten eine signifikant schlechtere Prognose in multivariaten Analysen (326 vs. 413 Tage, $p = 0,036$). In der Literatur ist die prognostische Bedeutung von *TP53* Alterationen umstritten. Während *TP53* Mutationen in niedriggradigen Astrozytomen mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert sind (Ständer et al. 2004), fanden andere Autoren eine bessere Prognose in AA (Smith et al. 2001) und GBM (Schmidt et al. 2002, Ohgaki et al. 2004, Chen et al. 2006). Wieder andere Studien fanden keinen Einfluss des *TP53*-Status auf die Prognose (Kraus et al. 2001b, Shiraishi et al. 2002, Rich et al. 2005). Batchelor et al. wiesen einen negativen prognostischen Effekt von *TP53* Mutationen in älteren und den gegenteiligen Effekt in jüngeren GBM-Patienten nach (Batchelor et al. 2004). Dagegen fanden Shih et al. ein besseres Überleben in GBM-Patienten über 57 Jahre (Shih et al. 2005). Burton et al. zeigten auffälligerweise die Expression von *TP53* ohne *TP53* Mutationen in Glioblastompatienten mit Langzeitüberleben und nahmen an, dass es sich evtl. um den Erhalt der Wildtyp-Variante handelt (Burton et al. 2002b).

In einer Interphase-FISH-Studie wurde gefunden, dass in vier von neun primären GBM in einem Teil der Zellen (20-30 %) die *TP53*-Region verloren und dieses mit erhöhter Zellproliferation assoziiert war (Horiguchi et al. 2001). Meine Studie bestätigte die Beobachtung von Horiguchi et al. 2001, dass in einigen GBM ein Teil der Zellen den Verlust von 17p aufwies, wobei die von mir untersuchten Patienten eine schlechtere Prognose zeigten, was durch eine erhöhte Zellproliferation erklärbar wäre.

Verlust von 9p: Verluste auf dem kurzen Arms von Chromosom 9 sind in Glioblastomen häufig (Collins 1999, Brat et al. 2004). In dieser Region liegt das Tumorsuppressorgen p16ink4a/CDKN2A, welches in Glioblastomen durch homozygote Deletionen inaktiviert ist (Maruno et al. 1996, Perry et al. 1997). Ich fand den Verlust von 9p in vier der 13 GBMO (31 %) und zwar sowohl in der „astrozytären“, als auch der „oligodendroglialen“ Gruppe. Dies passt zu den Beobachtungen, dass der Verlust von 9p sowohl in Astrozytomen als auch in Oligoastrozytomen und Oligodendrogliomen einen Progressionsmarker darstellt (Kleihues et al. 1995, Ohgaki et al. 1995, Fuller et al. 2003, Fallon et al. 2004). Auch Misra et al., die Glioblastome in drei genetische Subgruppen einteilten, beschrieben den Verlust von 9p sowohl in der Gruppe mit +7/-10, der Gruppe mit

nur -10 und der Gruppe ohne +7/-10 (Misra et al. 2005). Die Aussagen zur prädiktiven Bedeutung von 9p bzw. p16 Deletionen sind kontrovers. Kamiryo et al. berichteten über eine signifikant schlechtere Prognose in Patienten mit GBM und homozygoter 9p Deletion (Kamiryo et al. 2002). Eine Studie dokumentierte eine verkürzte Überlebenszeit in Patienten älter als 50 Jahre (Labuhn et al. 2001), wohingegen Shih et al. über eine längere Überlebenszeit von Patienten ≥ 57 Jahre berichteten (Shih et al. 2005). Hingegen fanden Ohgaki et al. keinen Einfluss in univariaten und multivariaten Analysen in einer großen populationsbasierten Studie (Ohgaki et al. 2004). Dies deckt sich mit meinen Ergebnissen, auch ich fand keinen Einfluss von 9p Deletionen auf die Prognose in den GBMO. Um die prognostische Bedeutung des Verlusts von 9p in den astrozytären und oligodendroglialen Tumoren zu klären, sind weitere Studien erforderlich.

Weitere häufig verlorene Regionen wurden auf **Chromosom 13 und 22** kartiert. Der Verlust von Chromosom 13 fand sich in fünf von 12 GBMO (42 %) mit einer minimal verlorenen Region 13q14-21, in der das Tumorsuppressorgen RB1 (Retinoblastom-1) liegt. Dies ist eine bekannte Veränderung in GBM (James und Collins 1992, Mohapatra et al. 1998, Nakamura et al. 2000). Auch der Verlust von Chromosom 22, den vier GBM (33 %) aufwiesen, wurde häufig in GBM gefunden (Mohapatra et al. 1998). Das verantwortliche Tumorsuppressorgen wurde bisher jedoch nicht identifiziert. Beide Veränderungen zeigten keinen Einfluss auf die Prognose.

Gewinn von 3q: Gewinne in dieser Region wurden erstmals von Mohapatra et al. in GBM beschrieben (Mohapatra et al. 1998). Ich fand den Gewinn auf 3q häufig (7/12, 58 %) in GBMO mit einer minimal gewonnenen Region auf +3q24-26. Diese Veränderung hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Überlebenszeit. In der CGH-Analyse der GBMO fand ich außerdem weitere aberrante Regionen, die in univariaten Analysen mit einer signifikant kürzeren Überlebenszeit verbunden waren: **-5q33-qter, -6p21, +6q, +13, -14**. Diese Veränderungen wurden, bis auf den Verlust von 14q, für Glioblastome, bisher nicht in der Literatur beschrieben. Auf 14q fanden Hu et al. zwei Regionen, die in GBM verloren waren, weshalb sie dort verschiedene Tumorsuppressorgene vermuten (Hu et al. 2002). In weiteren Studien muss evaluiert werden, welche Gene in diesen Regionen liegen, und ob sich der Einfluss dieser Veränderungen auf die Prognose bestätigt oder nicht.

Amplifikationen: Die häufigste Amplifikation, die in fünf der 12 mittels CGH-Analyse untersuchten GBMO (42 %) gefunden wurde, war eine Amplifikation der Bande 7p12, in der sich das **EGFR-Gen** befindet. Dies entspricht der Häufigkeit (30-40 %) in bisherigen Untersuchungen an Glioblastomen (Schröck et al. 1994, Smith et al. 2001, Behin et al. 2003, Ohgaki 2005) sowie der Untersuchung von He et al. an GBMO (44 %)

(He et al. 2001). Interessanterweise fanden sich Amplifikationen des *EGFR*-Gens jedoch nur in den Tumoren, welche genetisch der „astrozytären“ Gruppe zugeordnet wurden. Dies stimmt mit anderen Studien an Glioblastomen (von Deimling et al. 1992b, Nishizaki et al. 1998) und anaplastischen Gliomen (Dehais et al. 2006) überein, in denen *EGFR* Amplifikationen nur in Kombination mit Verlust von Chromosom 10 auftraten. In der Literatur werden GBM auf Grund der Klinik in zwei Gruppen unterteilt und diese mit bestimmten genetischen Veränderungen in Verbindung gebracht (Ueki et al. 2002): primäre GBM, in denen *EGFR* Amplifikationen typisch sind und sekundäre GBM, die häufig *TP53* Mutationen aufweisen (Kleihues und Ohgaki 1999, Schmidt et al. 2002). Interessanterweise fand sich in meiner Serie, entgegen bisherigen Berichten (Watanabe et al. 1996, He et al. 2001), auch in einem sekundären GBMO (ID 12) eine *EGFR* Amplifikation. Meine Ergebnisse sprechen dafür, dass *EGFR* Amplifikationen und Verlust von 17p mit verschiedenen genetischen Entstehungswegen assoziiert sind, aber nicht mit der klinischen Beobachtung eines sekundären oder primären GBM. Auch Schmidt et al. wiesen darauf hin, dass *TP53* Verluste und Deletionen zwar häufiger in sekundären GBM vorkommen, aber nicht zur Unterscheidung zwischen primären und sekundären GBM verwendet werden können (Schmidt et al. 2002). Die derzeitig vorliegenden Literaturdaten zur prognostischen Relevanz von *EGFR* Amplifikation sind erneut sehr widersprüchlich. Während *EGFR* Amplifikationen in einigen Studien mit einer schlechten Prognose assoziiert waren (Hiesiger et al. 1993, Zhu et al. 1996, Etienne et al. 1998, Korshunov et al. 1999) zeigten andere Autoren keinen (Huncharek und Kupelnick 2000, Kraus et al. 2000a, Schmidt et al. 2002, Lopez-Gines et al. 2005, Rich et al. 2005, Shih et al. 2005) oder sogar einen günstigen Einfluss auf die Prognose nach (Smith et al. 2001, Houillier et al. 2006). Einige Studien wiesen darauf hin, dass *EGFR* Amplifikationen häufiger in GBM von älteren Patienten gefunden werden (von Deimling et al. 2000) und bei älteren Patienten mit einer günstigeren, bei jüngeren Patienten mit einer schlechteren Prognose verbunden sind (Batchelor et al. 2004)(Simmons et al. 2001). Ohgaki et al. demonstrierten jedoch in einer großen populationsbasierten Studie an 715 GBM, dass *EGFR* Amplifikationen in keiner Altersgruppe einen Einfluss auf das Überleben hatten (Ohgaki et al. 2004). Auch in den von mir untersuchten GBMO fand sich kein Einfluss einer *EGFR* Amplifikation auf das Überleben. Insgesamt sind *EGFR* Amplifikationen daher meiner Meinung nach eher ein diagnostischer Marker für GBM der genetisch „astrozytären“ Gruppe, als ein prognostischer Marker in GBM.

Die zweithäufigste Amplifikation, die von mir in zwei der 12 GBMO gefunden wurde, lag in der Chromosomenbande 4q12, auf der sich das ***PDGFRA*-Gen** (Plättchenwachs-

tumsfaktorrezeptor Alpha) befindet. Diese Amplifikation wurde erstmals von Schröck et al. in zwei von sieben Glioblastomen beschrieben (Schröck et al. 1994). Amplifikationen von *PDGFRA* in Glioblastomen sind jedoch eher selten (Fleming et al. 1992, Hermanson et al. 1996). Smith et al. untersuchten 167 Astrozytome (147 GBM und 20 anaplastische Astrozytome) sowie 41 Oligodendrogliome und 29 Mischgliome auf *PDGFRA* Amplifikationen (Smith et al. 2000b). Sie fanden diese in vier Oligodendrogliomen und einem Mischgliom, welche jeweils Malignitätszeichen entsprechend dem WHO-Grad IV aufwiesen, jedoch in keinem der untersuchten Astrozytome und schlussfolgerten, dass diese Veränderungen oligodendroglialen Tumoren hoher Malignität vorbehalten ist. Die Häufigkeit der Amplifikation von 4q12 in meiner Serie (2 von 12 GBMO, 16 %) unterstützt diese These. Auch Reifenberger et al. beschrieben *PDGFRA* Amplifikationen als Progressionsmarker in Oligoastrozytomen (Reifenberger und Louis 2003). Interessanterweise fand ich in beiden Fällen mit Amplifikation von 4q12 gleichzeitig eine Amplifikation von 2p23. Eine isolierte Amplifikation von 2p23 fand sich in keinem der 12 GBMO. Dies wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Evtl. liegen in dieser Region bisher nicht identifizierte Gene, die mit dem *PDGFRA* Signalweg verbunden sind.

Eine weitere Amplifikation in den von mir untersuchten Tumoren lag in 20p12 und wurde auch von Brunner et al. in einem Glioblastom beschrieben, welches sich sekundär aus einem anaplastischen Oligoastrozytom entwickelte (Brunner et al. 2000). In dieser Region liegt das Gen *CDC25B*, ein Zellzyklus-Regulator-Gen, welches mit Entstehung und Progression in Tumoren in Verbindung gebracht wird. Nakabayashi et al. fanden eine erhöhte Expression von *CDC25B* in 10 von 17 anaplastischen Astrozytomen und 18 von 19 GBM, jedoch nicht in niedriggradigen Astrozytomen, sowie einen signifikanten Zusammenhang zwischen steigendem Malignitätsgrad und schlechtem klinischem Verlauf mit erhöhter *CDC25B* Expression (Nakabayashi et al. 2006). Somit könnte in der Region 20p12 ein weiterer Progressionsmarker für GBM kartieren.

Typischerweise fanden sich Amplifikationen auf 4q12, 2p23 und 20p12 nur in der Gruppe der Patienten mit GBMO, die eine Überlebenszeit von unter einem Jahr aufwiesen. Grundsätzlich sind Amplifikationen überwiegend in hochmalignen Karzinomen zu finden. In Zusammenschau mit der Literatur (siehe oben) könnten die gefundenen Amplifikationen somit mögliche Malignitätsmarker in diesen Tumoren darstellen.

Ich fand weitere, jeweils einmal vorkommende Amplifikationen, welche in Glioblastomen beschrieben sind: amp1q31-32 (*GAC1*, *MDM4*) (Riemenschneider et al. 2003), amp12p13 (Schröck et al. 1994), amp7q11-21 (*CDK6*) (Schröck et al. 1994, Costello et al. 1997), amp12q13-14 (*MDM2*, *CDK4*, *GLI*, *SAS*) (Reifenberger et al. 1993), amp20q13

(*STK 15*) (Reichardt et al. 2003), amp17q22-25 (Huhn et al. 1999). Diese hatten, bis auf amp7q11-21, welche mit einem signifikant schlechterem Überleben assoziiert war ($p = 0,038$), keinen Einfluss auf die Prognose.

Außerdem identifizierte ich vier bisher nicht in Glioblastomen bekannte amplifizierte Regionen: amp7p15-21, amp11q14-22, amp18q11 und amp21q21. Eine Amplifikation von 7p15-21 war mit einem signifikant schlechterem Überleben in der Kaplan-Meier-Analyse verbunden ($p = 0,001$) und fand sich, wie Amplifikationen von 11q14-22, 18q11 und 21q21 nur in der Gruppe der Patienten mit einer Überlebenszeit von weniger als einem Jahr. Meine Ergebnisse zeigten, dass es noch weitere, bisher nicht identifizierte Gene gibt, die in Glioblastomen amplifiziert sind und die evtl. prognostisch relevant sein *könnten*.

Unterschiede zwischen astrozytärem und oligodendroglialem Anteil

Die für die Einteilung in die genetischen Gruppen bisher entscheidenden Veränderungen – Verlust von 1p und 19q, Gewinn von Chromosom 7 und Verlust von Chromosom 10 – fanden sich immer in beiden histologischen Anteilen der von mir untersuchten GBMO. Was weitere genetische Veränderungen angeht, unterschieden sich die zwei Anteile nicht wesentlich. Dies belegt, dass GBMO einen monoklonalen Ursprung haben. Molekulargenetische Untersuchungen an kleinen Fallzahlen von Oligoastrozytomen (Kraus et al. 1995, Dong et al. 2002, Watanabe et al. 2002) bzw. GBMO (Walker et al. 2003) sprachen einerseits ebenfalls für einen monoklonalen Ursprung, fanden jedoch auch Hinweise auf Biklonalität (Dong et al. 2002). Die hier präsentierte Arbeit ist jedoch die erste Studie, die die CGH-Analyse kombiniert mit der Interphase-FISH-Technik verwendet, und somit einen Überblick über die gesamten genomischen Veränderungen der astrozytären und der oligodendroglialen Anteile der GBMO gibt. Es ist somit meiner Meinung nach nicht auszuschließen, dass in den zwei von Dong et al. 2002 beschriebenen „biklonalen“ Tumoren durchaus andere, nicht untersuchte Veränderungen vorlagen, die in beiden Anteilen gleich sind.

Ich fand jeweils auch einzelne zusätzliche Veränderungen entweder im astrozytären oder oligodendroglialen Anteil. Es handelte sich dabei jedoch nicht um so spezifische Aberrationen, dass sich die beiden Anteile dadurch eindeutig unterscheiden ließen.

Da sich die GBMO jedoch nach den bisher verwendeten Kriterien aus vier genetisch unterschiedlichen Gruppen zusammensetzen, werden diese im Folgenden getrennt betrachtet.

GBM-like Tumoren bzw. „astrozytäre“ Gruppe: In den sechs GBMO, von denen

beide Anteile zur Verfügung standen, stimmten die Anteile in den meisten Aberrationen überein. Es fanden sich auch einzelne zusätzliche Aberrationen jeweils nur im astrozytären oder oligodendroglialen Anteil. Außerdem gab es Veränderungen, wie z. B. Verluste auf Chromosom 4, 6 und 13, die sich in einem Tumor im oligodendroglialen, in einem anderen im astrozytären und in wieder einem anderen in beiden Anteilen fanden.

GBMO-*other*-Tumoren:

„Oligodendroglialer“ Tumor (ID6): Der 1p/19q-Verlust fand sich sowohl im oligodendroglialen als auch im astrozytären Anteil des Tumors. Bemerkenswert war, dass die Häufigkeit von Zellen mit 1p/19q-Verlust im oligodendroglialen Anteil deutlich höher war als im astrozytären Anteil. Neben dem 1p/19q-Verlust zeigten im astrozytären Anteil zusätzliche Veränderungen, die dafür bekannt sind, dass sie mit maligner Progression in Gliomen assoziiert sind (-4q,-6q,-9p,-13q,-8q). Außerdem fanden sich im astrozytären Anteil auch Zellen nur mit dem Verlust von 1p oder nur mit dem Verlust von 19p. Es wäre möglich, dass diese Zellen die jeweils anderen, evtl. ursprünglichen 1p/19q-Verluste wieder verloren haben. Z. B. beschrieben Jeuken et al. den Übergang vom „oligodendroglialen“ zum „intermediären“ Genotyp in einem Oligoastrozytom (Jeuken et al. 2001).

„Intermediärer“ Tumor (ID1): Beide Tumoranteile wiesen den Gewinn von Chromosom 7 und den Verlust von 1p36 sowie weitere Veränderungen auf und zeigten somit ebenfalls den monoklonalen Ursprung. Zusätzlich fand sich ein Gewinn von 18q nur im astrozytären Anteil und ein Verlust von 13q14-21 nur im oligodendroglialen Anteil.

In der **Gruppe „andere“** (ID 3,11) (ID 3, 11) fanden sich in beiden Anteilen der Tumoren ID 3 und 11 ein Gewinn von 3q und 9p sowie der Verlust von 17p, welche bekannt sind für astrozytäre Tumoren (Mohapatra et al. 1998, Collins 1999, Schmidt et al. 2002, Korshunov et al. 2004). In Tumor ID 11 fand sich jedoch ein kombinierter Verlust des kurzen Arms und Gewinn des langen Arms von Chromosom 3. Diese Veränderung wurde in Plattenepithelkarzinomen, z. B. der Cervix uteri, beschrieben (Heselmeyer et al. 1996) und fand sich häufig in Plattenepithelkarzinomen der Lunge (Petersen et al. 1997, Björkqvist et al. 1998, Pei et al. 2001, Garnis et al. 2006). Welche die ursprünglichen Veränderungen sind, bleibt spekulativ, doch auch hier war in beiden Tumoren der monoklonale Ursprung der phänotypisch heterogenen Tumorteile eindeutig. Zusätzlich fanden sich jeweils auch unterschiedliche Aberrationen. Der für Gliome untypische Gewinn von Chromosom 10 war in beiden Tumoren jeweils nur im oligodendroglialen Anteil vorhanden und fand sich nur in dieser Gruppe. Der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 16p dagegen war nur im astrozytären Anteil beider Tumoren und in keinem weiteren Tumor einer anderen Gruppe vorhanden. Die Bedeutung dieser Veränderungen ist derzeit

unklar.

Es ist bekannt, dass klassische hochmaligne GBM, wie auch eine Vielzahl anderer epithelialer Tumore, auf Grund klonaler Expansion bei einer Vielzahl rekurrenter Aberrationen auch eine deutliche genetische Heterogenität aufweisen (Misra et al. 2000, Loeper et al. 2001). Ich gehe darum davon aus, dass die Unterschiede in den genetischen Profilen der astrozytären und oligodendroglialen Anteile durch Erwerb zusätzlicher genetischer Veränderungen während der Tumorentwicklung im jeweiligen Mikromilieu entstanden sind. Dafür spricht, dass es sich zumindest in den GBMO der ersten drei genetischen Gruppen mit den typischen glialen Veränderungen zumeist um Veränderungen handelte, die mit Progression und Malignisierung in Gliomen verbunden sind (-4,-6q,-9p,-13,-18) (Schröck et al. 1994, Bigner et al. 1999, Wooten et al. 1999, Fallon et al. 2004).

In der Interphase-FISH-Analyse zeigte sich, dass sich die beiden phänotypisch verschiedenen Anteile in Bezug auf die Anzahl der Zellen mit den übereinstimmenden Aberrationen unterschieden. Dies ist zum einen auf unterschiedliche Anteile an normalen Zellen zurückzuführen (vgl. 5.2.2, Abb. 5.5). Zum anderen wird die Ursache auch in der genannten intratumoralen Heterogenität und die Dauer der Tumorgenese zu finden sein. Erneut zeigte sich der in astrozytären Tumoren bekannte Verlust von 17p in zwei Tumoren häufiger im astrozytären als im oligodendroglialen Anteil (ID 11 und 12).

Herkunft der GBMO

Die GBMO wurden in dieser Arbeit in vier genetisch unterschiedliche Gruppen unterteilt, die bereits für die Oligoastrozytome gezeigt worden waren (Jeuken et al. 2001). Dies spricht meiner Meinung nach dafür, dass die Subgruppen der GBMO, wie auch die Oligoastrozytome, auf unterschiedlichen genetischen Entstehungswegen basieren. Damit könnten die GBMO Oligoastrozytomen des WHO-Grades IV entsprechen, bzw. die gleiche Herkunft wie Oligoastrozytome haben. Weiterhin sprechen dafür auch die von mir in den GBMO gefundenen Amplifikationen auf 4q12 und 20p12, welche in der Literatur ebenfalls mit oligodendroglialem Phänotyp und Malignität in Verbindung gebracht worden (Brunner et al. 2000, Smith et al. 2000b, Reifenberger und Louis 2003). Die Herkunft der Oligoastrozytome, welche auch als Mischgliome bezeichnet werden, ist bis heute umstritten. Diese Tumoren müssen von sogenannten „Kollisionstumoren“, welche sich nebeneinander in einem Gewebe entwickeln, unterschieden werden. Zwei Entstehungswege, monoklonale und polyklonale Entwicklung, waren vorgeschlagen worden. Mehrere Studien sprachen für einen monoklonalen Ursprung der Oligoastrozytome (Kraus et al.

1995, Dong et al. 2002, Watanabe et al. 2002). Meine Ergebnisse an 13 GBMO belegten den monoklonalen Ursprung für alle untersuchten Tumore. Es fanden sich auch keine spezifischen genetischen Veränderungen immer nur in einem der beiden Anteile, die den unterschiedlichen genetischen Phänotyp erklären könnten. Ich nehme deshalb an, dass sich GBMO (und auch Oligoastrozytome) in einer Vorläuferzelle entwickeln, welche noch das Potential zur oligodendroglialen und astrozytären Differenzierung besitzt. Auch andere Autoren gehen davon aus, dass sich Tumoren aus gewebespezifischen Stammzellen entwickeln können (Reya et al. 2001, Crowe et al. 2004, Martínez-Climent et al. 2006). Unterstützt wird diese These durch Beobachtungen, dass sich in verschiedenen Tumoren Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften fanden (Burkert et al. 2006). Galli et al. isolierten solche Tumorzellen aus Glioblastomen, welche in vitro das Potential zu oligodendroglialer und astrozytärer Differenzierung aufwiesen (Galli et al. 2004). Eine andere Erklärung wäre jedoch auch, dass der unterschiedliche Phänotyp auf epigenetischen Veränderungen beruht und auf Grund von Transdifferenzierung im Laufe der Tumorentwicklung entsteht. So zeigten Hu et al. erstmals an Mäusen, dass durch den Eingriff in Signaltransduktionswege eine Umwandlung von astrozytären Tumorzellen in oligodendrogliale Tumorzellen möglich ist (Hu et al. 2005).

Wurden die 13 GBMO unterteilt in GBMO-H und GBMO-R, zeigte sich, dass nur die GBMO-H die vier genetischen Gruppen aufwiesen, während alle GBMO-R genetisch den klassischen GBM entsprachen. Dies könnte bedeuten, dass nur die GBMO-H Oligoastrozytomen WHO-Grad IV entsprechen, und es sich bei den GBMO-R möglicherweise um GBM mit einer anderen „besonderen Differenzierung“ handelt. Unabhängig davon zeigen meine Ergebnisse jedoch, dass beide Gruppen im Vergleich zu den klassischen GBM mit einer besseren Prognose verbunden sind. Dies lässt vermuten, dass es noch weitere, bisher unbekannte Faktoren gibt, die für die günstige Prognose verantwortlich sind, und dass der besondere Phänotyp dafür einen Marker darstellt, jedoch nicht die Ursache ist.

Bei zwei der 13 GBMO handelte es sich klinisch um sekundäre GBM, die übrigen waren primäre GBM. Ein sekundäres GBMO (ID 12) entwickelte sich aus einem anaplastischen Oligodendrogliom (WHO-Grad III). Interessanterweise entsprach das GBMO ID 12 histologisch den GBMO-R, besaß also nicht mehr die typischen Honigwabenzellen, und hatte den „astrozytären“ Genotyp. Dieser Tumor zeigte trotzdem ein für GBM relativ langes Überleben (479 Tage). Dies spricht noch einmal dafür, dass in der Diagnostik der GBMO nicht nur auf die typischen Honigwabenzellen geachtet werden sollte (vgl. 6.2.1). He et al. beschrieben fünf sekundäre GBMO, die sich aus Oligodendrogliomen

WHO-Grad II und III entwickelten (He et al. 2001). dass Oligodendrogliome zu GBM malignisieren können ist ebenfalls in der Literatur belegt (Kleihues et al. 1993a, Bigner et al. 1999, Burger und Scheithauer 2004). Das zweite sekundäre GBM (ID 1) entstand dagegen aus einem anaplastischen Astrozytom (WHO-Grad III).

Insgesamt sprechen meine Ergebnisse dafür, dass es sich bei GBMO um eine heterogene Gruppe von Tumoren mit unterschiedlichem genetischen Entstehungswegen und monoklonalem Ursprung handelt, welche sich z. T. sekundär aus Oligodendrogliomen und Astrozytomen entwickeln, jedoch überwiegend primär entstehen.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass Patienten mit einem *Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente* (GBMO) signifikant länger überlebten als Patienten mit einem klassischem Glioblastom (GBM). Ich halte darum die histologische Abgrenzung dieser Tumoren von klassischen GBM für prognostisch bedeutsam und empfehlen, die Diagnose GBMO zukünftig in die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems aufzunehmen. Auf Grund meiner Ergebnisse sollten die histologischen Kriterien für eine oligodendrogliale Komponente sowohl Areale mit typischen Honigwabenzellen und GFAP-Negativität einschließen, als auch Areale bestehend aus gleichförmigen, rundlichen, und ebenfalls GFAP-negativen Zellen, da beide mit einer günstigen Prognose verbunden waren. Die prädiktive Bedeutung dieser besonderen histologischen Differenzierung muss in prospektiven Studien bestätigt werden.

Durch molekular-zytogenetische Untersuchung der beiden histologisch unterschiedlichen Anteile – oligodendrogliale und astrozytäre – der GBMO konnte ich zeigen, dass diese einen monoklonalen Ursprung haben. Ich fand keine rekurrenten genetischen Veränderungen nur in jeweils einem der beiden Anteile und schlussfolgerte daraus, dass möglicherweise auch epigenetische Veränderungen für den unterschiedlichen histologischen Phänotyp verantwortlich sind. Ebenso gab es keine spezifischen genetischen Veränderungen, durch die sich die GBMO eindeutig von klassischen GBM unterschieden. Der nächste Schritt sollte deshalb darin bestehen, die Gen-Expression der unterschiedlichen Anteile von GBMO mittels Expressions-*Arrays* zu untersuchen, um so möglicherweise die Ursachen des histologischen Phänotyps und somit der günstigen Prognose der GBMO aufzuklären.

Mit meinem selbst entwickelten SONDENSET für die Interphase-FISH-Analyse ließen sich die GBMO in vier genetische Gruppen einteilen: eine „astrozytäre“, eine „oligodendrogliale“, eine „intermediäre“ und eine „andere“ Gruppe. Im Gegensatz dazu entsprachen alle klassischen GBMO genetisch der „astrozytären“ Gruppe. Ich gehe davon aus, dass den genetischen Gruppen unterschiedliche genetische Entstehungswege zugrundeliegen. Die gleichen vier genetischen Gruppen wurden für Oligoastrozytome beschrieben (Jeuken et al. 2001). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass zumindest ein Teil der GBMO

Oligoastrozytomen des WHO-Grades IV entsprechen, im Gegensatz zu klassischen GBM, welche den astrozytären Tumoren zugeordnet werden (Kleihues und Cavenee 2000). Die Tatsache, dass sich histologisch nicht differenzierbare Gliome aus unterschiedlichen genetischen Gruppen zusammensetzen, bedeutet meiner Meinung nach, dass in zukünftigen Studien zur Validierung prognostischer Marker nicht nur die Histologie der Gliome, sondern auch deren genetische Einteilung einfließen muss. Meine Ergebnisse weisen darauf hin, dass die prognostische Bedeutung genetischer Marker abhängig von dem zugrundeliegenden genetischen Entstehungsweg sein könnte.

Die Patienten der Gruppe „andere“, deren Tumore für Gliome untypische genetische Veränderungen aufwiesen, zeigten im Vergleich zu den Patienten der weiteren drei genetischen Gruppen eine signifikant längere Überlebenszeit. Ich identifizierte außerdem zusätzliche, teilweise bisher in Gliomen nicht beschriebene Aberrationen, welche mit einer signifikant längeren bzw. kürzeren Überlebenszeit in den Glioblastompatienten verbunden waren.

Die Bestimmung molekular-zytogenetischer Parameter stellt somit (1) eine wichtige Ergänzung der histologischen Diagnostik der Gliome dar und liefert (2) prognostisch relevante Informationen, die allein durch die morphologische Klassifikation nicht gewonnen werden können. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse gehe ich davon aus, dass nicht ein einzelner, sondern eine Kombination von genetischen Markern untersucht werden sollte, um eindeutige prognostische Aussagen treffen zu können. Darum möchte ich in zukünftigen Studien das von mir entwickelte Sondenset, welches eine genetische Einteilung der Gliome ermöglicht, ergänzt um zusätzliche, von mir identifizierte, für die Prognose interessante Kandidatenregionen, an einer großen Serie von Gliomen anwenden. Für die klinische Anwendung muss die prädiktive Bedeutung der genetischen Parameter in prospektiven Studien eingehend evaluiert werden.

Schließlich bedarf es der routinemäßigen Etablierung molekulargenetischer Tests für die klinische Diagnostik. Die vorliegende Arbeit belegt, dass die Interphase-FISH-Analyse mit meinen Modifizierungen eine zuverlässige Methode für die Untersuchung von Tumorgewebe darstellt. Auf Grund ihrer Durchführbarkeit an in der Routinopathologie vorliegenden Paraffinschnitten stellt sie eine vielversprechende Methode für die klinische Anwendung dar. Die CGH-Analyse konnte ebenfalls für die Anwendung an Paraffinmaterial etabliert werden, auf Grund ihrer Aufwändigkeit bleibt sie meiner Meinung nach jedoch wissenschaftlichen Untersuchungen vorbehalten. Dabei ist von Vorteil, dass für weitere Studien die hochauflösende *Array*-CGH-Methodik mit Expressionsstudien des gesamten Genoms kombiniert werden kann.

Literaturverzeichnis

- Alonso ME, Bello MJ, Lomas J, Gonzalez-Gomez P, Arjona D, Campos JMD, Gutierrez M, Isla A, Vaquero J, Rey JA. 2001. Absence of mutation of the p73 gene in astrocytic neoplasms. *Int J Oncol*, 19(3):609–612.
- Arslantas A, Artan S, Oner U, Müslümanolu H, Durmaz R, Cosan E, Atasoy MA, Baaran N, Tel E. 2004. The importance of genomic copy number changes in the prognosis of glioblastoma multiforme. *Neurosurg Rev*, 27(1):58–64.
- Balesaria S, Brock C, Bower M, Clark J, Nicholson SK, Lewis P, de Sanctis S, Evans H, Peterson D, Mendoza N, Glaser MG, Newlands ES, Fisher RA. 1999. Loss of chromosome 10 is an independent prognostic factor in high-grade gliomas. *Br J Cancer*, 81(8):1371–1377.
- Baretton GB, Müller M, Wirtz A, Murken J, Arnholdt H. 1998. [Numerical chromosome aberrations in abortion tissue. Comparison of conventional cytogenetics and interphase cytogenetics in paraffin sections and nuclear suspensions]. *Pathologe*, 19(2):120–128.
- Batchelor TT, Betensky RA, Esposito JM, Pham LDD, Dorfman MV, Piscatelli N, Jung S, Rhee D, Louis DN. 2004. Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 10(1 Pt 1):228–233.
- Bauman GS, Ino Y, Ueki K, Zlatescu MC, Fisher BJ, Macdonald DR, Stitt L, Louis DN, Cairncross JG. 2000. Allelic loss of chromosome 1p and radiotherapy plus chemotherapy in patients with oligodendrogliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 48(3):825–830.
- Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY. 2003. Primary brain tumours in adults. *Lancet*, 361(9354):323–331.
- Bello MJ, Leone PE, Nebreda P, de Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Sarasa JL, García-Miguel P, Queizan A, Hernández-Moneo JL. 1995. Allelic status of chromosome 1 in neoplasms of the nervous system. *Cancer Genet Cytogenet*, 83(2):160–164.

- van den Bent MJ. 2004. Diagnosis and management of oligodendroglioma. *Semin Oncol*, 31(5):645–652.
- van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJB, Bernsen HJJA, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipos L, Haaxma-Reiche H, Kros JM, van Kouwenhoven MCM, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T. 2006. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol*, 24(18):2715–2722.
- Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Döhner H, Lichter P. 1998. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 21(2):172–175.
- Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H. 1997. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56(2):180–185.
- Bigner SH, Matthews MR, Rasheed BK, Wiltshire RN, Friedman HS, Friedman AH, Stenzel TT, Dawes DM, McLendon RE, Bigner DD. 1999. Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol*, 155(2):375–386.
- Bigner SH, Schröck E. 1997. Molecular cytogenetics of brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56(11):1173–1181.
- Björkqvist AM, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Karjalainen A, Tammilehto L, Mattson K, Vainio H, Knuutila S. 1998. DNA gains in 3q occur frequently in squamous cell carcinoma of the lung, but not in adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 22(1):79–82.
- Brat DJ, Seiferheld WF, Perry A, Hammond EH, Murray KJ, Schulsinger AR, Mehta MP, Curran WJ, Group RTO. 2004. Analysis of 1p, 19q, 9p, and 10q as prognostic markers for high-grade astrocytomas using fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays from Radiation Therapy Oncology Group trials. *Neuro-oncol*, 6(2):96–103.

- Brunner C, Jung V, Henn W, Zang KD, Urbschat S. 2000. Comparative genomic hybridization reveals recurrent enhancements on chromosome 20 and in one case combined amplification sites on 15q24q26 and 20p11p12 in glioblastomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 121(2):124–127.
- Buckner JC, Reid JM, Wright K, Kaufmann SH, Erlichman C, Ames M, Cha S, O’Fallon JR, Schaaf LJ, Miller LL. 2003. Irinotecan in the treatment of glioma patients: current and future studies of the North Central Cancer Treatment Group. *Cancer*, 97(9 Suppl):2352–2358.
- Burger PC, Green SB. 1987. Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer*, 59(9):1617–1625.
- Burger PC, Scheithauer BW. 2004. Tumors of the central nervous system. Bethesda: Armed Forces Institute of Pathology.
- Burkert J, Wright NA, Alison MR. 2006. Stem cells and cancer: an intimate relationship. *J Pathol*, 209(3):287–297.
- Burton EC, Lamborn KR, Feuerstein BG, Prados M, Scott J, Forsyth P, Passe S, Jenkins RB, Aldape KD. 2002a. Genetic aberrations defined by comparative genomic hybridization distinguish long-term from typical survivors of glioblastoma. *Cancer Res*, 62(21):6205–6210.
- Burton EC, Lamborn KR, Forsyth P, Scott J, O’Campo J, Uyehara-Lock J, Prados M, Berger M, Passe S, Uhm J, O’Neill BP, Jenkins RB, Aldape KD. 2002b. Aberrant p53, mdm2, and proliferation differ in glioblastomas from long-term compared with typical survivors. *Clin Cancer Res*, 8(1):180–187.
- Cairncross G, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Mehta M, Curran W. 2006. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol*, 24(18):2707–2714.
- Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN. 1998. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst*, 90(19):1473–1479.

- Cao W, Hashibe M, Rao JY, Morgenstern H, Zhang ZF. 2003. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detect Prev*, 27(5):397–404.
- Chandler KL, Prados MD, Malec M, Wilson CB. 1993. Long-term survival in patients with glioblastoma multiforme. *Neurosurgery*, 32(5):716–20; discussion 720.
- Chen YJ, Hakin-Smith V, Teo M, Xinarianos GE, Jellinek DA, Carroll T, McDowell D, MacFarlane MR, Boet R, Baguley BC, Braithwaite AW, Reddel RR, Royds JA. 2006. Association of mutant TP53 with alternative lengthening of telomeres and favorable prognosis in glioma. *Cancer Res*, 66(13):6473–6476.
- Collins VP. 1999. Progression as exemplified by human astrocytic tumors. *Semin Cancer Biol*, 9(4):267–276.
- Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Pearl DK. 1997. Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer*, 79(7):1381–1393.
- Coons SW, Johnson PC, Shapiro JR. 1995. Cytogenetic and flow cytometry DNA analysis of regional heterogeneity in a low grade human glioma. *Cancer Res*, 55(7):1569–1577.
- Costello JF, Plass C, Arap W, Chapman VM, Held WA, Berger MS, Huang HJS, Cavenee WK. 1997. Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. *Cancer Res*, 57(7):1250–1254.
- Coura R, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P. 2005. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol*, 58(8):894–895.
- de Crevoisier R, Pierga JY, Dendale R, Feuvret L, Noël G, Simon JM, Mazon JJ. 1997. [Radiotherapy of glioblastoma]. *Cancer Radiother*, 1(3):194–207.
- Crowe DL, Parsa B, Sinha UK. 2004. Relationships between stem cells and cancer stem cells. *Histol Histopathol*, 19(2):505–509.

- Curran WJ, Scott CB, Horton J, Nelson JS, Weinstein AS, Fischbach AJ, Chang CH, Rotman M, Asbell SO, Krisch RE. 1993. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. *J Natl Cancer Inst*, 85(9):704–710.
- Daumas-Duport C, Scheithauer B, O’Fallon J, Kelly P. 1988. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer*, 62(10):2152–2165.
- Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, Lasken RS. 2001. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res*, 11(6):1095–1099.
- DeAngelis LM, Burger PC, Green SB, Cairncross JG. 1998. Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy? *Ann Neurol*, 44(4):691–695.
- Decaestecker C, Camby I, Gordower L, Dewitte O, Cras P, Martin JJ, Pasteels JL, Ham PV, Brothi J, Kiss R, Salmon I. 1998. Characterization of astroglial versus oligodendroglial phenotypes in glioblastomas by means of quantitative morphonuclear variables generated by computer-assisted microscopy. *J Neuropathol Exp Neurol*, 57(8):791–802.
- Dehais C, Laigle-Donadey F, Marie Y, Kujas M, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Pedretti M, Polivka M, Xuan KH, Thillet J, Delattre JY, Sanson M. 2006. Prognostic stratification of patients with anaplastic gliomas according to genetic profile. *Cancer*, 107(8):1891–1897.
- von Deimling A, Albrecht S, Wiestler OD. 1994a. [Progression-associated gene regions in astrocytomas: a candidate locus on chromosome 19q]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 78:423–426.
- von Deimling A, von Ammon K, Schoenfeld D, Wiestler OD, Seizinger BR, Louis DN. 1993. Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol*, 3(1):19–26.
- von Deimling A, Bender B, Jahnke R, Waha A, Kraus J, Albrecht S, Wellenreuther R, Fassbender F, Nagel J, Menon AG. 1994b. Loci associated with malignant progression in astrocytomas: a candidate on chromosome 19q. *Cancer Res*, 54(6):1397–1401.

- von Deimling A, Eibl RH, Ohgaki H, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Kleihues P, Chung RY, Wiestler OD, Seizinger BR. 1992a. p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytoma. *Cancer Res*, 52(10):2987–2990.
- von Deimling A, Fimmers R, Schmidt MC, Bender B, Fassbender F, Nagel J, Jahnke R, Kaskel P, Duerr EM, Koopmann J, Maintz D, Steinbeck S, Wick W, Platten M, Müller DJ, Przkora R, Waha A, Blümcke B, Wellenreuther R, Meyer-Puttlitz B, Schmidt O, Mollenhauer J, Poustka A, Stangl AP, Lenartz D, von Ammon K. 2000. Comprehensive allelotype and genetic analysis of 466 human nervous system tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59(6):544–558.
- von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Hoell T, Chung RY, Martuza RL, Schoenfeld DA, Yargil MG, Wiestler OD. 1992b. Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*, 77(2):295–301.
- von Deimling A, Louis DN, Wiestler OD. 1995. Molecular pathways in the formation of gliomas. *Glia*, 15(3):328–338.
- Dong ZQ, Pang JCS, Tong CYK, Zhou LF, Ng HK. 2002. Clonality of oligoastrocytomas. *Hum Pathol*, 33(5):528–535.
- Etienne MC, Formento JL, Lebrun-Frenay C, Gioanni J, Chatel M, Paquis P, Bernard C, Courdi A, Bensadoun RJ, Pignol JP, Francoual M, Grellier P, Frenay M, Milano G. 1998. Epidermal growth factor receptor and labeling index are independent prognostic factors in glial tumor outcome. *Clin Cancer Res*, 4(10):2383–2390.
- Fallon KB, Palmer CA, Roth KA, Nabors LB, Wang W, Carpenter M, Banerjee R, Forsyth P, Rich K, Perry A. 2004. Prognostic value of 1p, 19q, 9p, 10q, and EGFR-FISH analyses in recurrent oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63(4):314–322.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. 2000. *Globocan 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide*. Lyon: IARC Press.
- Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP. 1993. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer*, 71(8):2585–2597.

- Fiveash JB, Spencer SA. 2003. Role of radiation therapy and radiosurgery in glioblastoma multiforme. *Cancer J*, 9(3):222–229.
- Fleming TP, Matsui T, Heidaran MA, Molloy CJ, Artrip J, Aaronson SA. 1992. Demonstration of an activated platelet-derived growth factor autocrine pathway and its role in human tumor cell proliferation in vitro. *Oncogene*, 7(7):1355–1359.
- Forsyth PA, Cairncross JG. 1995. Treatment of malignant glioma in adults. *Curr Opin Neurol*, 8(6):414–418.
- Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. 2000. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest*, 80(1):65–72.
- Fuller CE, Schmidt RE, Roth KA, Burger PC, Scheithauer BW, Banerjee R, Trinkaus K, Lytle R, Perry A. 2003. Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in morphologically ambiguous gliomas with hybrid oligodendroglial/astrocytic features. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62(11):1118–1128.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, Vitis SD, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. 2004. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*, 64(19):7011–7021.
- Ganju V, Jenkins RB, O’Fallon JR, Scheithauer BW, Ransom DT, Katzmann JA, Kimmel DW. 1994. Prognostic factors in gliomas. A multivariate analysis of clinical, pathologic, flow cytometric, cytogenetic, and molecular markers. *Cancer*, 74(3):920–927.
- Garnis C, Lockwood WW, Vucic E, Ge Y, Girard L, Minna JD, Gazdar AF, Lam S, MacAulay C, Lam WL. 2006. High resolution analysis of non-small cell lung cancer cell lines by whole genome tiling path array CGH. *Int J Cancer*, 118(6):1556–1564.
- Gelpi E, Ambros IM, Birner P, Luegmayr A, Drlicek M, Fischer I, Kleinert R, Maier H, Huemer M, Gatterbauer B, Anton J, Rössler K, Budka H, Ambros PF, Hainfellner JA. 2003. Fluorescent in situ hybridization on isolated tumor cell nuclei: a sensitive method for 1p and 19q deletion analysis in paraffin-embedded oligodendroglial tumor specimens. *Mod Pathol*, 16(7):708–715.

- He J, Hoang-Xuan K, Marie Y, Leuraud P, Mokhtari K, Kujas M, Delattre JY, Sanson M. 2000. P18 tumor suppressor gene and progression of oligodendrogliomas to anaplasia. *Neurology*, 55(6):867–869.
- He J, Mokhtari K, Sanson M, Marie Y, Kujas M, Huguet S, Leuraud P, Capelle L, Delattre JY, Poirier J, Hoang-Xuan K. 2001. Glioblastomas with an oligodendroglial component: a pathological and molecular study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60(9):863–871.
- Hermanson M, Funa K, Koopmann J, Maintz D, Waha A, Westermarck B, Heldin CH, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A, Nistér M. 1996. Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas. *Cancer Res*, 56(1):164–171.
- Heselmeyer K, Schröck E, du Manoir S, Blegen H, Shah K, Steinbeck R, Auer G, Ried T. 1996. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(1):479–484.
- Hess KR, Broglio KR, Bondy ML. 2004. Adult glioma incidence trends in the United States, 1977–2000. *Cancer*, 101(10):2293–2299.
- Hiesiger EM, Hayes RL, Pierz DM, Budzilovich GN. 1993. Prognostic relevance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and c-neu/erbB2 expression in glioblastomas (GBMs). *J Neurooncol*, 16(2):93–104.
- Hildebrand J, Sahmoud T, Mignolet F, Brucher JM, Afra D. 1994. Adjuvant therapy with dibromodulcitol and BCNU increases survival of adults with malignant gliomas. EORTC Brain Tumor Group. *Neurology*, 44(8):1479–1483.
- Hilton DA, Penney M, Pobereskin L, Sanders H, Love S. 2004. Histological indicators of prognosis in glioblastomas: retinoblastoma protein expression and oligodendroglial differentiation indicate improved survival. *Histopathology*, 44(6):555–560.
- Hirose Y, Aldape KD, Chang S, Lamborn K, Berger MS, Feuerstein BG. 2003. Grade II astrocytomas are subgrouped by chromosome aberrations. *Cancer Genet Cytogenet*, 142(1):1–7.
- Hoang-Xuan K, He J, Huguet S, Mokhtari K, Marie Y, Kujas M, Leuraud P, Capelle L, Delattre JY, Poirier J, Broët P, Sanson M. 2001. Molecular heterogeneity of

- oligodendrogliomas suggests alternative pathways in tumor progression. *Neurology*, 57(7):1278–1281.
- Hofer S, Roelcke U, Herrmann R. 1999. [New aspects of interdisciplinary therapy for malignant gliomas in adults]. *Schweiz Med Wochenschr*, 129(37):1332–1341.
- Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, Yonekawa Y, Patre PLD, Franceschi S, Ohgaki H. 2006. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65(9):846–854.
- Horiguchi H, Sano T, Hirose T. 2001. TP53 deleted cells in de novo glioblastomas using fluorescence in situ hybridization. *Pathol Int*, 51(3):187–192.
- Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Laigle-Donadey F, Criniere E, Mokhtari K, Thillet J, Delattre JY, Hoang-Xuan K, Sanson M. 2006. Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer*, 106(10):2218–2223.
- Hu J, Pang JCS, Tong CYK, Lau B, Yin XL, Poon WS, Jiang CC, Zhou LF, Ng HK. 2002. High-resolution genome-wide allelotype analysis identifies loss of chromosome 14q as a recurrent genetic alteration in astrocytic tumours. *Br J Cancer*, 87(2):218–224.
- Hu X, Pandolfi PP, Li Y, Koutcher JA, Rosenblum M, Holland EC. 2005. mTOR promotes survival and astrocytic characteristics induced by Pten/AKT signaling in glioblastoma. *Neoplasia*, 7(4):356–368.
- Huang J, Wei W, Zhang J, Liu G, Bignell GR, Stratton MR, Futreal PA, Wooster R, Jones KW, Shaperro MH. 2004. Whole genome DNA copy number changes identified by high density oligonucleotide arrays. *Hum Genomics*, 1(4):287–299.
- Huang Q, Schantz SP, Rao PH, Mo J, McCormick SA, Chaganti RS. 2000. Improving degenerate oligonucleotide primed PCR-comparative genomic hybridization for analysis of DNA copy number changes in tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 28(4):395–403.
- Huhn SL, Mohapatra G, Bollen A, Lamborn K, Prados MD, Feuerstein BG. 1999. Chromosomal abnormalities in glioblastoma multiforme by comparative genomic hybridization: correlation with radiation treatment outcome. *Clin Cancer Res*, 5(6):1435–1443.

- Huncharek M, Kupelnick B. 2000. Epidermal growth factor receptor gene amplification as a prognostic marker in glioblastoma multiforme: results of a meta-analysis. *Oncol Res*, 12(2):107–112.
- Husemann K, Wolter M, Büschges R, Boström J, Sabel M, Reifenberger G. 1999. Identification of two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 and rare mutation of the CDKN2C gene from 1p32 in oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58(10):1041–1050.
- Ino Y, Betensky RA, Zlatescu MC, Sasaki H, Macdonald DR, Stemmer-Rachamimov AO, Ramsay DA, Cairncross JG, Louis DN. 2001. Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis. *Clin Cancer Res*, 7(4):839–845.
- Ino Y, Zlatescu MC, Sasaki H, Macdonald DR, Stemmer-Rachamimov AO, Jhung S, Ramsay DA, von Deimling A, Louis DN, Cairncross JG. 2000. Long survival and therapeutic responses in patients with histologically disparate high-grade gliomas demonstrating chromosome 1p loss. *J Neurosurg*, 92(6):983–990.
- Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, DeLeeuw RJ, Chi B, Coe BP, Snijders A, Albertson DG, Pinkel D, Marra MA, Ling V, MacAulay C, Lam WL. 2004. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet*, 36(3):299–303.
- Jaecle KA, Ballman KV, Rao RD, Jenkins RB, Buckner JC. 2006. Current strategies in treatment of oligodendroglioma: evolution of molecular signatures of response. *J Clin Oncol*, 24(8):1246–1252.
- James CD, Collins VP. 1992. Molecular genetic characterization of CNS tumor oncogenesis. *Adv Cancer Res*, 58:121–142.
- Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, Flynn H, Passe S, Felten S, Brown PD, Shaw EG, Buckner JC. 2006. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res*, 66(20):9852–9861.
- Jenkins RB, Curran W, Scott CB, Cairncross G. 2001. Pilot evaluation of 1p and 19q deletions in anaplastic oligodendrogliomas collected by a national cooperative cancer treatment group. *Am J Clin Oncol*, 24(5):506–508.

- Jeuken JW, Sprenger SH, Boerman RH, von Deimling A, Teepen HL, van Overbeeke JJ, Wesseling P. 2001. Subtyping of oligo-astrocytic tumours by comparative genomic hybridization. *J Pathol*, 194(1):81–87.
- Jeuken JW, Sprenger SH, Wesseling P, Macville MV, von Deimling A, Teepen HL, van Overbeeke JJ, Boerman RH. 1999. Identification of subgroups of high-grade oligodendroglial tumors by comparative genomic hybridization. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58(6):606–612.
- Jones BW, Fetter RD, Tear G, Goodman CS. 1995. glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell*, 82(6):1013–1023.
- Jung V, Romeike BF, Henn W, Feiden W, Moringlane JR, Zang KD, Urbschat S. 1999. Evidence of focal genetic microheterogeneity in glioblastoma multiforme by area-specific CGH on microdissected tumor cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58(9):993–999.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258(5083):818–821.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. 1994. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 10(4):231–243.
- Kamiryo T, Tada K, Shiraishi S, Shinojima N, Nakamura H, Kochi M, ichi Kuratsu J, Saya H, Ushio Y. 2002. Analysis of homozygous deletion of the p16 gene and correlation with survival in patients with glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*, 96(5):815–822.
- Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, Cartalat-Carel S, Frenay M, Kantor G, Guillelmo JS, Jadaud E, Colin P, Bondiau PY, Meneï P, Loiseau H, Bernier V, Honnorat J, Barrié M, Mokhtari K, Mazon JJ, Bissery A, Delattre JY, of French-Speaking Neuro-Oncologists A. 2007. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. *N Engl J Med*, 356(15):1527–1535.
- Kim L, Hochberg FH, Thornton AF, Harsh GR, Patel H, Finkelstein D, Louis DN. 1996. Procarbazine, lomustine, and vincristine (PCV) chemotherapy for grade III and grade IV oligoastrocytomas. *J Neurosurg*, 85(4):602–607.

- Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Newcomb EW, Ohgaki H, Cavenee WK. 2000. Glioblastoma., Kap In: P. Kleihues, W. K. Cavenee (ed.). The WHO Classification of Tumours of the Nervous System: Pathology and genetics of tumours of the nervous system. 29–39.
- Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. 1993a. Histological typing of tumours of the central nervous system: WHO international histological classification. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. 1993b. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol*, 3(3):255–268.
- Kleihues P, Cavenee K, Hrsg. 2000. The WHO classification of tumours of the nervous system: Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon: IARC Press.
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. 2002. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(3):215–25; discussion 226–9.
- Kleihues P, Ohgaki H. 1999. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncol*, 1(1):44–51.
- Kleihues P, Soylemezoglu F, Schäuble B, Scheithauer BW, Burger PC. 1995. Histopathology, classification, and grading of gliomas. *Glia*, 15(3):211–221.
- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmüller G. 1999. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(8):4494–4499.
- Koch J, Kølvraa S, Bolund L. 1986. An improved method for labelling of DNA probes by nicktranslation. *Nucleic Acids Res*, 14(17):7132.
- Korshunov A, Golanov A, Sycheva R, Pronin I. 1999. Prognostic value of tumour associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas: an analysis of 168 cases. *J Clin Pathol*, 52(8):574–580.
- Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. 2004. Molecular stratification of diagnostically challenging high-grade gliomas composed of small cells: the utility of fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res*, 10(23):7820–7826.

- Kortmann RD, Jeremic B, Weller M, Plasswilm L, Bamberg M. 2003. Radiochemotherapy of malignant glioma in adults. Clinical experiences. *Strahlenther Onkol*, 179(4):219–232.
- Koschny R, Koschny T, Froster UG, Krupp W, Zuber MA. 2002. Comparative genomic hybridization in glioma: a meta-analysis of 509 cases. *Cancer Genet Cytogenet*, 135(2):147–159.
- Kraus JA, Glesmann N, Beck M, Krex D, Klockgether T, Schackert G, Schlegel U. 2000a. Molecular analysis of the PTEN, TP53 and CDKN2A tumor suppressor genes in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*, 48(2):89–94.
- Kraus JA, Koopmann J, Kaskel P, Maintz D, Brandner S, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD, von Deimling A. 1995. Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 54(1):91–95.
- Kraus JA, Lamszus K, Glesmann N, Beck M, Wolter M, Sabel M, Krex D, Klockgether T, Reifenberger G, Schlegel U. 2001a. Molecular genetic alterations in glioblastomas with oligodendroglial component. *Acta Neuropathol (Berl)*, 101(4):311–320.
- Kraus JA, Wenghoefer M, Glesmann N, Mohr S, Beck M, Schmidt MC, Schröder R, Berweiler U, Roggendorf W, Diete S, Dietzmann K, Heuser K, Müller B, Fimmers R, von Deimling A, Schlegel U. 2001b. TP53 gene mutations, nuclear p53 accumulation, expression of Waf/p21, Bcl-2, and CD95 (APO-1/Fas) proteins are not prognostic factors in de novo glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*, 52(3):263–272.
- Kraus JA, Wenghoefer M, Schmidt MC, von Deimling A, Berweiler U, Roggendorf W, Diete S, Dietzmann K, Müller B, Heuser K, Reifenberger G, Schlegel U. 2000b. Long-term survival of glioblastoma multiforme: importance of histopathological reevaluation. *J Neurol*, 247(6):455–460.
- Krebsgesellschaft D. 2003. Leitlinie "Maligne Gliome" der Deutschen Gesellschaft für Neurologie zugleich der Deutschen Krebsgesellschaft und Ihrer Arbeitsgemeinschaften [www.http://www.dgn.org/fileadmin/leitl/2003/TumorenGliome.pdf](http://www.dgn.org/fileadmin/leitl/2003/TumorenGliome.pdf). Website.
- Kros JM, van Run PR, Alers JC, Beverloo HB, van den Bent MJ, Avezaat CJ, van Dekken H. 1999. Genetic aberrations in oligodendroglial tumours: an analysis using comparative genomic hybridization (CGH). *J Pathol*, 188(3):282–288.

- Kuukasjärvi T, Tanner M, Pennanen S, Karhu R, Visakorpi T, Isola J. 1997. Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 18(2):94–101.
- Labuhn M, Jones G, Speel EJ, Maier D, Zweifel C, Gratzl O, Meir EGV, Hegi ME, Merlo A. 2001. Quantitative real-time PCR does not show selective targeting of p14(ARF) but concomitant inactivation of both p16(INK4A) and p14(ARF) in 105 human primary gliomas. *Oncogene*, 20(9):1103–1109.
- Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW. 1994. Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg*, 81(3):427–436.
- Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(11):6633–6637.
- Leenstra S, Bijlsma EK, Troost D, Oosting J, Westerveld A, Bosch DA, Hulsebos TJ. 1994. Allele loss on chromosomes 10 and 17p and epidermal growth factor receptor gene amplification in human malignant astrocytoma related to prognosis. *Br J Cancer*, 70(4):684–689.
- Legler, LA GR, Smith, Warren, Heineman, Kaplan, Linet. 1999. RESPONSE: Re: Brain and Other Central Nervous System Cancers: Recent Trends in Incidence and Mortality. *J Natl Cancer Inst*, 91(23):2050A–22051.
- Lengauer C, Dunham I, Featherstone T, Cremer T. 1994. Generation of alphoid DNA probes for fluorescence in situ hybridization (FISH) using the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*, 33:51–61.
- Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC, Ward DC. 1998. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet*, 19(3):225–232.
- Loeper S, Romeike BF, Heckmann N, Jung V, Henn W, Feiden W, Zang KD, Urbschat S. 2001. Frequent mitotic errors in tumor cells of genetically micro-heterogeneous glioblastomas. *Cytogenet Cell Genet*, 94(1-2):1–8.

- Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Gil-Benso R, Pellin A, Lopez-Guerrero JA, Callaghan R, Benito R, Roldan P, Piquer J, Llacer J, Barbera J. 2005. Association of chromosome 7, chromosome 10 and EGFR gene amplification in glioblastoma multiforme. *Clin Neuropathol*, 24(5):209–218.
- Louis DN, Pomeroy SL, Cairncross JG. 2002. Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer Cell*, 1(2):125–128.
- Ludwig CL, Smith MT, Godfrey AD, Armbrustmacher VW. 1986. A clinicopathological study of 323 patients with oligodendrogliomas. *Ann Neurol*, 19(1):15–21.
- Macdonald DR. 2003. New frontiers in the treatment of malignant glioma. *Semin Oncol*, 30(6 Suppl 19):72–76.
- Magnani I, Moroni RF, Ramona RF, Roversi G, Beghini A, Pfundt R, Schoenmakers EF, Larizza L. 2005. Identification of oligodendroglioma specific chromosomal copy number changes in the glioblastoma MI-4 cell line by array-CGH and FISH analyses. *Cancer Genet Cytogenet*, 161(2):140–145.
- du Manoir S, Schröck E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P, Cremer T. 1995. Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry*, 19(1):27–41.
- Martínez-Climent JA, Andreu EJ, Prosper F. 2006. Somatic stem cells and the origin of cancer. *Clin Transl Oncol*, 8(9):647–663.
- Maruno M, Yoshimine T, Muhammad AK, Tokiyoshi K, Hayakawa T. 1996. Loss of heterozygosity of microsatellite loci on chromosome 9p in astrocytic tumors and its prognostic implications. *J Neurooncol*, 30(1):19–24.
- McLendon RE, Halperin EC. 2003. Is the long-term survival of patients with intracranial glioblastoma multiforme overstated? *Cancer*, 98(8):1745–1748.
- MedicalResearchCouncil. 2001. Medical Research Council Brain Tumor Working Party: Randomized trial of procarbazine, lomustine, and vincristine in the adjuvant treatment of high-grade astrocytoma: A Medical Research Council trial. *J Clin Oncol*, (19):509–518.
- Mineo JF, Bordron A, Baroncini M, Ramirez C, Maura CA, Blond S, Dam-Hieu P. 2007. Prognosis factors of survival time in patients with glioblastoma multiforme: a multivariate analysis of 340 patients. *Acta Neurochir (Wien)*, 149(3):245–253.

- Misra A, Chattopadhyay P, Dinda AK, Sarkar C, Mahapatra AK, Hasnain SE, Sinha S. 2000. Extensive intra-tumor heterogeneity in primary human glial tumors as a result of locus non-specific genomic alterations. *J Neurooncol*, 48(1):1–12.
- Misra A, Pellarin M, Nigro J, Smirnov I, Moore D, Lamborn KR, Pinkel D, Albertson DG, Feuerstein BG. 2005. Array comparative genomic hybridization identifies genetic subgroups in grade 4 human astrocytoma. *Clin Cancer Res*, 11(8):2907–2918.
- Mohapatra G, Bollen AW, Kim DH, Lamborn K, Moore DH, Prados MD, Feuerstein BG. 1998. Genetic analysis of glioblastoma multiforme provides evidence for subgroups within the grade. *Genes Chromosomes Cancer*, 21(3):195–206.
- Morita M, Rosenblum MK, Bilsky MH, Fraser RA, Rosenfeld MR. 1996. Long-term survivors of glioblastoma multiforme: clinical and molecular characteristics. *J Neurooncol*, 27(3):259–266.
- Mueller W, Hartmann C, Hoffmann A, Lanksch W, Kiwit J, Tonn J, Veelken J, Schramm J, Weller M, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A. 2002. Genetic signature of oligoastrocytomas correlates with tumor location and denotes distinct molecular subsets. *Am J Pathol*, 161(1):313–319.
- Nakabayashi H, Hara M, Shimizu K. 2006. Prognostic significance of CDC25B expression in gliomas. *J Clin Pathol*, 59(7):725–728.
- Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. 2000. Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59(6):539–543.
- Nishizaki T, Ozaki S, Harada K, Ito H, Arai H, Beppu T, Sasaki K. 1998. Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 21(4):340–346.
- Ohgaki H. 2005. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology*, 25(1):1–7.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Patre PLD, Burkhard C, Schüller D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yatsargil MG, Lütolf UM, Kleihues P. 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*, 64(19):6892–6899.

- Ohgaki H, Kleihues P. 2005a. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, 109(1):93–108.
- Ohgaki H, Kleihues P. 2005b. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64(6):479–489.
- Ohgaki H, Schäuble B, zur Hausen A, von Ammon K, Kleihues P. 1995. Genetic alterations associated with the evolution and progression of astrocytic brain tumours. *Virchows Arch*, 427(2):113–118.
- Okamoto Y, Patre PLD, Burkhard C, Horstmann S, Jourde B, Fahey M, Schüler D, Probst-Hensch NM, Yasargil MG, Yonekawa Y, Lütolf UM, Kleihues P, Ohgaki H. 2004. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, 108(1):49–56.
- Olson JD, Riedel E, DeAngelis LM. 2000. Long-term outcome of low-grade oligodendroglioma and mixed glioma. *Neurology*, 54(7):1442–1448.
- Pardue ML, Gall JG. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, 168(937):1356–1358.
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas D. 2002. Cancer incidence in five continents. Lyon: IARC Press.
- Patt S, Gries H, Giraldo M, Cervos-Navarro J, Martin H, Jänisch W, Brockmüller J. 1996. p53 gene mutations in human astrocytic brain tumors including pilocytic astrocytomas. *Hum Pathol*, 27(6):586–589.
- Paulus W. 2002. Tumoren, Kap In: J. Pfeiffer and J.M. Schröder and W. Paulus (Hrsg.). *Neuropathologie: Morphologische Diagnostik der Krankheiten des Nervensystems und der Skelettmuskulatur*. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer. 337–393.
- Paulus W, Peiffer J. 1989. Intratumoral histologic heterogeneity of gliomas. A quantitative study. *Cancer*, 64(2):442–447.
- Pei J, Balsara BR, Li W, Litwin S, Gabrielson E, Feder M, Jen J, Testa JR. 2001. Genomic imbalances in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 31(3):282–287.

- Perry A, Nobori T, Ru N, Anderl K, Borell TJ, Mohapatra G, Feuerstein BG, Jenkins RB, Carson DA. 1997. Detection of p16 gene deletions in gliomas: a comparison of fluorescence in situ hybridization (FISH) versus quantitative PCR. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56(9):999–1008.
- Petersen I, Bujard M, Petersen S, Wolf G, Goeze A, Schwendel A, Langreck H, Gellert K, Reichel M, Just K, du Manoir S, Cremer T, Dietel M, Ried T. 1997. Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res*, 57(12):2331–2335.
- Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J. 1988. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(23):9138–9142.
- Pinto LW, Chimelli L. 2004. [Oligodendroglial and neuronal component in glioblastomas: possible relation with prognosis]. *Arq Neuropsiquiatr*, 62(4):1074–1078.
- Piper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. 1995. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry*, 19(1):10–26.
- Pirker C, Raidl M, Steiner E, Elbling L, Holzmann K, Spiegl-Kreinecker S, Aubele M, Grasl-Kraupp B, Marosi C, Micksche M, Berger W. 2004. Whole genome amplification for CGH analysis: Linker-adapter PCR as the method of choice for difficult and limited samples. *Cytometry A*, 61(1):26–34.
- Prados M. 2000. Neoplasms of the central nervous system, Kap In: Bast R, Kufe D, Pollock R, Weichselbaum R, Holland J, Frei E. (ed.): *Cancer medicine*. Hamilton: Decker, 1055–1082.
- Radner H, Blümcke I, Reifenberger G, Wiestler OD. 2002. [The new WHO classification of tumors of the nervous system 2000. Pathology and genetics]. *Pathologe*, 23(4):260–283.
- Reichardt W, Jung V, Brunner C, Klein A, Wemmert S, Romeike BFM, Zang KD, Urbschat S. 2003. The putative serine/threonine kinase gene STK15 on chromosome 20q13.2 is amplified in human gliomas. *Oncol Rep*, 10(5):1275–1279.

- Reifenberger G. 1991. Immunhistochemie der Tumoren des Nervensystems. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP. 1993. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res*, 53(12):2736–2739.
- Reifenberger G, Louis DN. 2003. Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62(2):111–126.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859):105–111.
- Rich JN, Hans C, Jones B, Iversen ES, McLendon RE, Rasheed BKA, Dobra A, Dressman HK, Bigner DD, Nevins JR, West M. 2005. Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res*, 65(10):4051–4058.
- Ried T, Heselmeyer-Haddad K, Blegen H, Schröck E, Auer G. 1999. Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer*, 25(3):195–204.
- Riemenschneider MJ, Knobbe CB, Reifenberger G. 2003. Refined mapping of 1q32 amplicons in malignant gliomas confirms MDM4 as the main amplification target. *Int J Cancer*, 104(6):752–757.
- Ries LA, Eisner M, Kosary CL, Hrsg. 2004. SEER cancer statistics review 1975-2001. Bethesda: National Cancer Institute.
- Robinson JB. 2001. Current protocols in cytometry. New York: John Wiley & Sons.
- Rosenberg JE, Lisle DK, Burwick JA, Ueki K, von Deimling A, Mohrenweiser HW, Louis DN. 1996. Refined deletion mapping of the chromosome 19q glioma tumor suppressor gene to the D19S412-STD interval. *Oncogene*, 13(11):2483–2485.
- Salazar OM, Rubin P, Feldstein ML, Pizzutiello R. 1979. High dose radiation therapy in the treatment of malignant gliomas: final report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 5(10):1733–1740.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: laboratory manual. Dritte Aufl. Aufl. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sasaki H, Zlatescu MC, Betensky RA, Johnk LB, Cutone AN, Cairncross JG, Louis DN. 2002. Histopathological-molecular genetic correlations in referral pathologist-diagnosed low-grade oligodendroglioma". *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(1):58–63.
- Sawaya R. 1999. Extent of resection in malignant gliomas: a critical summary. *J Neurooncol*, 42(3):303–305.
- Scherer H. 1940. Cerebral astrocytomas and their derivatives. *Am J Cancer*, 40:159–198.
- Schlegel J, Peraud A, Bise K. 2001. Manual Hirntumoren und primäre Tumoren des Rückenmarks, Kap In: WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems. München: Tumorzentrum, 15–36.
- Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP. 1994. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res*, 54(24):6321–6324.
- Schmidt MC, Antweiler S, Urban N, Mueller W, Kuklik A, Meyer-Puttlitz B, Wiestler OD, Louis DN, Fimmers R, von Deimling A. 2002. Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(4):321–328.
- Schröck E, Blume C, Meffert MC, du Manoir S, Bersch W, Kiessling M, Lozanowa T, Thiel G, Witkowski R, Ried T, Cremer T. 1996. Recurrent gain of chromosome arm 7q in low-grade astrocytic tumors studied by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 15(4):199–205.
- Schröck E, Thiel G, Lozanova T, du Manoir S, Meffert MC, Jauch A, Speicher MR, Nürnberg P, Vogel S, Jänisch W. 1994. Comparative genomic hybridization of human malignant gliomas reveals multiple amplification sites and nonrandom chromosomal gains and losses. *Am J Pathol*, 144(6):1203–1218.
- Schubert R, Eggermann T, Hofstaetter C, von Netzer B, Knöpfle G, Schwanitz G. 2002. Clinical, cytogenetic, and molecular findings in 45,X/47,XX,+18 mosaicism: clinical report and review of the literature. *Am J Med Genet*, 110(3):278–282.
- Scott CB, Scarantino C, Urtasun R, Movsas B, Jones CU, Simpson JR, Fischbach AJ, Curran WJ. 1998a. Validation and predictive power of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) recursive partitioning analysis classes for malignant glioma patients: a report using RTOG 90-06. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 40(1):51–55.

- Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PM, Fulton D, Hagen NA, MacKinnon JA, Sutherland G, Cairncross JG, Forsyth P. 1998b. Long-term glioblastoma multiforme survivors: a population-based study. *Can J Neurol Sci*, 25(3):197–201.
- Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Mahaley MS, Selker RG, VanGilder JC, Robertson JT, Ransohoff J, Mealey J, Strike TA. 1989. Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001. *J Neurosurg*, 71(1):1–9.
- Shaw EG, Scheithauer BW, O’Fallon JR. 1997. Supratentorial gliomas: a comparative study by grade and histologic type. *J Neurooncol*, 31(3):273–278.
- Shih HA, Betensky RA, Dorfman MV, Louis DN, Loeffler JS, Batchelor TT. 2005. Genetic analyses for predictors of radiation response in glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 63(3):704–710.
- Shiraishi S, Tada K, Nakamura H, Makino K, Kochi M, Saya H, ichi Kuratsu J, Ushio Y. 2002. Influence of p53 mutations on prognosis of patients with glioblastoma. *Cancer*, 95(2):249–257.
- Simpson JR, Horton J, Scott C, Curran WJ, Rubin P, Fischbach J, Isaacson S, Rotman M, Asbell SO, Nelson JS. 1993. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 26(2):239–244.
- Smith JS, Alderete B, Minn Y, Borell TJ, Perry A, Mohapatra G, Hosek SM, Kimmel D, O’Fallon J, Yates A, Feuerstein BG, Burger PC, Scheithauer BW, Jenkins RB. 1999. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene*, 18(28):4144–4152.
- Smith JS, Jenkins RB. 2000. Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front Biosci*, 5:D213–D231.
- Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O’Fallon J, Hosek SM, Kimmel D, Yates A, Burger PC, Scheithauer BW, Jenkins RB. 2000a. Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol*, 18(3):636–645.

- Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, O'Fallon JR, Schaefer PL, Scheithauer BW, James CD, Buckner JC, Jenkins RB. 2001. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst*, 93(16):1246–1256.
- Smith JS, Wang XY, Qian J, Hosek SM, Scheithauer BW, Jenkins RB, James CD. 2000b. Amplification of the platelet-derived growth factor receptor-A (PDGFRA) gene occurs in oligodendrogliomas with grade IV anaplastic features. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59(6):495–503.
- Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA. 1997. *Cells: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press.
- Speicher MR, du Manoir S, Schröck E, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Lengauer C, Cremer T, Ried T. 1993. Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. *Hum Mol Genet*, 2(11):1907–1914.
- Stege EM, Kros JM, de Bruin HG, Enting RH, van Heuvel I, Looijenga LHJ, van der Rijt CDD, Smitt PAES, van den Bent MJ. 2005. Successful treatment of low-grade oligodendroglial tumors with a chemotherapy regimen of procarbazine, lomustine, and vincristine. *Cancer*, 103(4):802–809.
- Stewart LA. 2002. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet*, 359(9311):1011–1018.
- Ständer M, Peraud A, Leroch B, Kreth FW. 2004. Prognostic impact of TP53 mutation status for adult patients with supratentorial World Health Organization Grade II astrocytoma or oligoastrocytoma: a long-term analysis. *Cancer*, 101(5):1028–1035.
- Stoecklein NH, Erbersdobler A, Schmidt-Kittler O, Diebold J, Schardt JA, Izicki JR, Klein CA. 2002. SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *Am J Pathol*, 161(1):43–51.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO,

- for Research EO, of Cancer Brain Tumor T, Groups R, of Canada Clinical Trials Group NCI. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352(10):987–996.
- Szöllösi J, Lockett SJ, Balázs M, Waldman FM. 1995. Autofluorescence correction for fluorescence in situ hybridization. *Cytometry*, 20(4):356–361.
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BA, Tunnacliffe A. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13(3):718–725.
- Tikoo A, Czekay S, Viars C, White S, Heath JK, Arden K, Maruta H. 2000. p190-A, a human tumor suppressor gene, maps to the chromosomal region 19q13.3 that is reportedly deleted in some gliomas. *Gene*, 257(1):23–31.
- Tortosa A, Viñolas N, Villà S, Verger E, Gil JM, Brell M, Caral L, Pujol T, Acebes JJ, Ribalta T, Ferrer I, Graus F. 2003. Prognostic implication of clinical, radiologic, and pathologic features in patients with anaplastic gliomas. *Cancer*, 97(4):1063–1071.
- Tsubosa Y, Sugihara H, Mukaisho KI, Kamitani S, Peng DF, Ling ZQ, Tani T, Hattori T. 2005. Effects of degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction amplification and labeling methods on the sensitivity and specificity of metaphase- and array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, 158(2):156–166.
- Ueki K, Nishikawa R, Nakazato Y, Hirose T, Hirato J, Funada N, Fujimaki T, Hojo S, Kubo O, Ide T, Usui M, Ochiai C, Ito S, Takahashi H, Mukasa A, Asai A, Kirino T. 2002. Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. *Clin Cancer Res*, 8(1):196–201.
- Waggoner A. 2006. Fluorescent labels for proteomics and genomics. *Curr Opin Chem Biol*, 10(1):62–66.
- Walker C, du Plessis DG, Joyce KA, Machell Y, Thomson-Hehir J, Haddad SAA, Broome JC, Warnke PC. 2003. Phenotype versus genotype in gliomas displaying inter- or intratumoral histological heterogeneity. *Clin Cancer Res*, 9(13):4841–4851.
- Walker MD, Alexander E, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Mealey J, Norrell HA, Owens G, Ransohoff J, Wilson CB, Gehan EA, Strike TA. 1978. Evaluation of

- BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg*, 49(3):333–343.
- Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. 1996. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol*, 6(3):217–23; discussion 23–4.
- Watanabe T, Nakamura M, Kros JM, Burkhard C, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. 2002. Phenotype versus genotype correlation in oligodendrogliomas and low-grade diffuse astrocytomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, 103(3):267–275.
- Weber RG, Sabel M, Reifenberger J, Sommer C, Oberstrass J, Reifenberger G, Kiessling M, Cremer T. 1996. Characterization of genomic alterations associated with glioma progression by comparative genomic hybridization. *Oncogene*, 13(5):983–994.
- Werner M, Wilkens L, Aubele M, Nolte M, Zitzelsberger H, Komminoth P. 1997. Interphase cytogenetics in pathology: principles, methods, and applications of fluorescence in situ hybridization (FISH). *Histochem Cell Biol*, 108(4-5):381–390.
- Wessels PH, Twijnstra A, Kessels AGH, Krijne-Kubat B, Theunissen PH, Ummelen MIJ, Ramaekers FCS, Hopman AH. 2002. Gain of chromosome 7, as detected by in situ hybridization, strongly correlates with shorter survival in astrocytoma grade 2. *Genes Chromosomes Cancer*, 33(3):279–284.
- Wiltshire RN, Rasheed BK, Friedman HS, Friedman AH, Bigner SH. 2000. Comparative genetic patterns of glioblastoma multiforme: potential diagnostic tool for tumor classification. *Neuro-oncol*, 2(3):164–173.
- Winger MJ, Macdonald DR, Cairncross JG. 1989. Supratentorial anaplastic gliomas in adults. The prognostic importance of extent of resection and prior low-grade glioma. *J Neurosurg*, 71(4):487–493.
- Wooten EC, Fults D, Duggirala R, Williams K, Kyritsis AP, Bondy ML, Levin VA, O’Connell P. 1999. A study of loss of heterozygosity at 70 loci in anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme with implications for tumor evolution. *Neuro Oncol*, 1(3):169–176.

-
- Zhong XB, Lizardi PM, Huang XH, Bray-Ward PL, Ward DC. 2001. Visualization of oligonucleotide probes and point mutations in interphase nuclei and DNA fibers using rolling circle DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(7):3940–3945.
- Zhu A, Shaeffer J, Leslie S, Kolm P, El-Mahdi AM. 1996. Epidermal growth factor receptor: an independent predictor of survival in astrocytic tumors given definitive irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 34(4):809–815.

A Danksagung

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Stephan Patt für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung, den Nachdruck zur rechten Zeit und seine Geduld mit mir trotz seiner neu gefundenen Berufung. Nach dem geistigen nun also der geistliche Beistand!

Frau Prof. Dr. med. Evelin Schröck, meiner „Doktormutter“, die mir alles von FISH bis Segelsurven beibrachte und mich so selbstverständlich in Ihrem Labor (und manchmal sogar Heim) aufnahm, für Nachtschichten und Expertenrat immer dann, wenn es mal wieder höchste Eisenbahn war.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Tumorgenetik (ehem. Charité Berlin, jetzt Institut für klinische Genetik TU Dresden), besonders Anja Matthäi, Anne Helmrich, Astrid Neidhardt, Karen Stout und Ulrike Montag für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit.

Meinem Bruder Martin und Ben Schlingelhof, für die Elefantenruhe beim Auszählen von 66.600 Punkten und der Beantwortung „unzählbarer“ Fragen zu Computern und Software. Ohne Euch hätte ich diese Arbeit wohl auf einer Schreibmaschine geschrieben.

Natürlich meinen Eltern Dagmar und Jürgen. Endlich geschafft!

Hansen. Weil du immer für mich da warst.

B Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. Stephan Patt und Frau Prof. Dr. med. Evelin Schröck,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift